

Bambini nati da PMA – Addenda

Su Human Reproduction Update (2004) Devroey e Van Steirteghem hanno recentemente pubblicato dati relativi a 10 anni di esperienza con la ICSI, utilizzando, almeno in parte, dati della Conferenza Internazionale Serono Symposia tenuta a Bruxelles nell'aprile del 2002.

Gli autori ripetono cose già note sui rischi legati all'uso del seme di uomini oligospermici e al prelievo di spermatozoi dal testicolo, per l'aumento di aneuploidie e di altre anomalie genetiche trasferite ai figli maschi. Ribadiscono che il maggior rischio dopo ICSI è la frequenza di gravidanze multiple, ricordando che più del 50% dei bambini nati da PMA non derivano da gravidanze singole e che è necessario cercare di evitare questo problema trasferendo un solo embrione e crioconservando gli altri embrioni prodotti (Garris e Van Royen 2000; Titinen e coll. 2001).

Riferiscono poi i risultati delle indagini genetiche prenatali eseguite nel 47% di 2622 gravidanze ICSI consecutive (49% di gravidanze singole e 43.5% di gravidanze multiple), per un totale di 1586 bambini. I cariotipi anomali sono stati 47 (2.96%); 25 anomalie (1.58%) erano de novo (10 dei cromosomi sessuali e 15 autosomiche, sia di numero che strutturali) e 22 ereditate (1.39%) (21 bilanciate e 1 sbilanciata).

Se la concentrazione dei nemaspermi era superiore ai 20 milioni le anomalie de novo erano pari allo 0,24%, mentre se era inferiore ai 20 milioni l'incidenza delle anomalie saliva al 2,1%. Differenze analoghe sono state osservate per la motilità del seme, ma non per la morfologia. In un unico caso su 94 l'anomalia cromosomica conseguiva all'impiego di spermatozoi prelevati dal testicolo.

Per valutare i dati postnatali i due autori hanno confrontato le schede relative a 2889 gravidanze ICSI e a 2995 gravidanze Fivet; i due gruppi avevano percentuali simili di gravidanze multiple ed erano omogenei per quanto poteva concernere le principali caratteristiche cliniche e sociali (tranne una maggiore età materna nelle ICSI). La prematurità era leggermente più frequente per l'ICSI (31,8%) che per la Fivet (29,3%) e, al contrario, il peso molto basso alla nascita si trovava più spesso nelle FIVET (5,6%) che nelle ICSI (4,4%). Le

malconformazioni maggiori (quelle cioè capaci di indurre anomalie funzionali o per le quali era necessaria una correzione chirurgica) erano presenti in modo pressochè uguale (3,4% per le ICSI, 3,8% per le Fivet), senza connessioni (per quanto concerne le ICSI) con l'origine o la qualità del seme. I nati morti (valutati dopo la 20a settimana di gravidanza) erano simili (1,69% ICSI; 1,31% Fivet). Le malconformazioni totali (anomalie maggiori nei nati morti, nei nati vivi e negli aborti) erano il 4,2% nelle ICSI e il 4,6% nelle Fivet, una differenza non significativa. Devroey e Van Steirteghem concludono questa parte della loro analisi affermando che le coppie debbono essere informate su tutti questi dati, ma che debbono anche sapere che alcune anomalie cromosomiche de novo hanno carattere relativamente benigno; una ulteriore informazione va data riguardo al fatto che i bambini ICSI non sono più a rischio di quelli Fivet.

Studi sperimentali hanno dimostrato che la ICSI è una tecnica che presenta alcuni rischi. In particolare l'uso di spermatozoi o di spermatozoi prelevati dal testicolo può essere causa di un aumento di rischi di anomalie dell'imprinting (Simerly e coll., 1995); si deve però tener conto del fatto che la cultura in vitro di embrioni di mammifero è causa di modificazioni del controllo dell'imprinting e che pertanto le tecniche di PMA per sé potrebbero essere chiamate in causa (Young e coll., 2001). Cox e coll. (2002) hanno riportato due casi di sindrome di Angelman in bambini ICSI dovute a un difetto sporadico dell'imprinting; le caratteristiche di questi casi hanno fatto pensare a un difetto post-zigotico epigenetico (e non ereditario) (De Rycke e coll., 2002) per un blocco dei fattori necessari per l'imprinting nel cromosoma 15 materno (ma ricerche specifiche su bambini ICSI non hanno trovato anomalie della metilazione di questo cromosoma). Casi di sindrome di Beckwith – Wiedemann (BWS) sono stati riportati da Sutcliffe e coll., (1997) e da Olivennes e coll., (2001); De Baun e coll., (2003), controllando i registri della malattia, hanno trovato che la BWS è più frequente nei bambini nati dopo PMA: si tratta di 7 bambini (5 nati da ICSI, dei quali 1 da seme prelevato dal testicolo). In 5 casi esistevano modificazioni epigenetiche associate con la sindrome.

Si può dunque ragionevolmente affermare che esiste qualcosa, all'interno delle tecniche di microiniezione, che si associa ad una

maggiore frequenza di anomalie epigenetiche capaci di determinare malconformazioni congenite. Poiché i disordini dell'imprinting sono rari (BWS e Prader Willi 1/15.000; Angelman 1/30.000) è necessario studiare una popolazione molto numerosa di bambini per accorgersi di un aumento di frequenza.

Considerata l'esistenza di una associazione tra BWS, tumori embrionali dell'infanzia e difetti della metilazione, si potrebbe postulare un aumento di questi tumori quando sono implicate anomalie della metilazione. Poiché l'incidenza del cancro nella sindrome BW in bambini di età inferiore ai 4 anni è 0,02 per 110 pazienti/anno, ci si dovrebbe attendere di imbattersi in questi problemi quando il numero di casi fosse sufficientemente ampio e il follow-up ben al di là del periodo neonatale (circa un caso su mille a 5 anni).

Sino ad oggi sono stati identificati circa 50 geni "imprinted" molti dei quali non sono stati clonati o di cui sono ignote le funzioni. Devroey e Van Stirteghem in una casistica di 2840 bambini ICSI non hanno trovato disordini dell'imprinting tranne un caso di onfalocela (e uno simile nei bambini Fivet) in cui però la diagnosi di BWS non è stata confermata. La stessa cosa si deve dire per uno studio che ha seguito lo sviluppo psicomotorio di 439 bambini ICSI per due anni. E' però possibile che la diagnosi di sindrome di Angelman possa essere fatta solo dopo i primi 2 anni di vita.

Il gruppo di studio di Bruxelles, Gothenburg e New York, non ha trovato disordini dell'imprinting in 300 bambini ICSI studiati a 5 anni d'età.

Ecco le conclusioni degli autori, su questo punto particolarmente importante: dai dati della letteratura si può affermare che esiste evidenza di un aumento del rischio di anomalie dell'imprinting nei bambini ICSI e che potrebbe esistere una associazione tra microiniezione e tumori dell'infanzia. D'altra parte solo un piccolo numero di osservazioni consente di ottenere dati sulla frequenza di questi eventi, così che solo una indagine sistematica rivolta a ricercare quelle sindromi e quelle malattie che hanno con certezza un fenotipo legato all'imprinting genomico può chiarire se le anomalie epigenetiche giocano un ruolo nella ICSI (e nella Fivet) e si ritrovano in questi bambini più spesso che in quelli nati spontaneamente.

Sia le ricerche eseguite sulla sindrome di Angelman che quelle relative alla BWS hanno messo in evidenza che la mancata

metilazione riguarda l'allele materno. E' dunque improbabile che il problema – se esiste – riguardi la maturazione del seme, mentre appare possibile che le tecniche disturbino la metilazione del genoma dell'ovocita o dell'embrione nei primi stadi.

Una particolare attenzione viene poi riservata ai pazienti azoospermici con sindrome di Klinefelter: 26 bambini sani nati sino al momento della raccolta dati e un solo caso di aneuploidia 46 XXY.

Le conclusioni degli Autori:

- la ICSI non dovrebbe essere eseguita nel caso di parametri seminali normali;
 - tra bambini ICSI si osserva un maggior numero di anomalie de novo sia dei cromosomi sessuali che degli autosomici;
 - la percentuale di malconformazioni maggiori tra i nati ICSI e i nati Fivet è simile;
 - esiste un aumento delle anomalie dell'imprinting nei bambini ICSI.
- Naturalmente, concludono gli Autori, prima di trarre conclusioni definitive sull'aumento delle malconformazioni fetali nei bambini ICSI e FIVET, è necessario attendere dati conclusivi (e perciò molto più approfonditi di quelli di cui disponiamo) sulle coppie ipofertili che riescono ad avere un figlio spontaneamente e sulle gravidanze che iniziano dopo lunghi periodi di oligo-ovulazione e dopo stimolazione ovarica. In definitiva, gli AA sembrano attenti al problema, ma non particolarmente preoccupati e ricordano che oggi più del 95% degli uomini può avere un figlio con il proprio seme grazie alla ICSI.

E' uscito recentemente su BMC (Medical informatics and decision making, 2004, 4;3) un articolo a firma di Mika Gissler e coll., che sembra compiere un passo avanti sulla strada della valutazione dei dati, come del resto recita lo stesso titolo: Monitoring of IVF birth outcomes in Finland: a data quality study.

Lo studio di questi Autori parte da un'analisi critica delle valutazioni eseguite in Finlandia a partire dal 1990. La prima, relativa alle nascite e ai bambini (1990-92) raccoglieva i dati nel National Birth Register. La seconda (che parte dal 1992) raccoglieva i dati relativi ai cicli di trattamento iniziati. Queste analisi vengono giudicate incomplete (es: nella prima, manca il 15% dei nati).

Per ovviare a questi errori gli Autori hanno confrontato dati provenienti da:

- dati raccolti sulle IVF dalla Società Finlandese di Ostetricia e Ginecologia;
- dati del registro nazionale delle nascite;
- dati raccolti dal National Social Insurance Institution per il rimborso dei trattamenti e dei farmaci.

I risultati dello studio sono confortanti per quanto riguarda gli esiti delle gravidanze, ma non altrettanto per quanto riguarda la frequenza delle malconformazioni, molto meno numerose nei dati della Società di Ginecologia (157 su 10.000 nati) che negli altri due registri (rispettivamente 422 e 409), dati tutti molto diversi dall'incidenza delle malconformazioni nella popolazione (288 su 10.000 casi). C'è da dire che i confronti sono difficili e che manca un controllo adeguato.

Roger Gosden e alcuni suoi collaboratori hanno pubblicato su Lancet (2003, 361, 1975-77) una "review" sul rapporto tra le nuove tecnologie riproduttive e la comparsa di anomalie congenite rare da difetti dell'imprinting genomico. Gli Autori riferiscono come siano stati pubblicati nel 2003 3 articoli che depongono per un aumento della frequenza della Beckwith – Wiedemann Sindrome (BWS) in bambini concepiti con PMA: 6 casi sul registro inglese, 6 nel registro francese e 7 negli Stati Uniti. Ciò si accompagna alla descrizione di casi sporadici di sindrome di Angelman.

Gli autori sottolineano come esista un disaccordo circa la frequenza di malconformazioni nei bambini PMA, considerata normale da alcuni, soprattutto in Europa, aumentata da altri (come ad esempio, gli Australiani). Gli studi sulle anomalie dell'imprinting, per la rarità della frequenza di queste sindromi, hanno bisogno di un numero maggiore di osservazioni.

A chi vuol leggere un'analisi interessante e completa della letteratura riguardante i bambini nati da ICSI consiglio un articolo di Christiane Wittemer e coll. (Les enfants de l'ICSI sous la loupe) comparso nel marzo 2004 su M/S: Medicine sciences (volume 20 n. 3). Mi limito a riferirne i punti più interessanti:

- sul rischio di veder nascere un bambino di peso inferiore alla norma, le conclusioni degli AA sono che si tratti di un problema che non riguarda le tecniche, ma piuttosto l'esistenza di fattori uterini sfavorevoli, più frequenti nelle donne che hanno subito cure per la loro sterilità;
- per quanto riguarda la presenza di malconformazioni, i dati sono purtroppo contrastanti. Da un lato, esiste la ricerca di autori australiani (Hansen e coll., 2002) che riferisce di un notevole aumento del rischio (9% nelle Fivet, 8,6% nelle ICSI, 4% nella popolazione generale). Questo rischio resta elevato anche tenendo conto delle gravidanze plurime, dell'età materna, della parità. Nel capitolo delle inquietudini bisogna inserire anche i dati (già citati in questo testo) sulle anomalie dell'imprinting genomico. In particolare gli AA ricordano l'aumento dei casi di reticoloblastoma e dei tumori dell'infanzia.

Esiste d'altra parte un numero elevato di pubblicazioni ottimiste (cito per tutte quelle di Wennerhorm e coll. pubblicate nel 2000 e quelle di Anthony e coll., del 2002).

L'ultima parte delle riflessioni degli Autori riguarda il follow up dei bambini PMA, dati già riferiti in altra parte di questo documento.

La conclusione degli AA è comunque interlocutoria. E' possibile che i rischi di malconformazione fetale siano aumentati, ma perché? Si tratta di problemi legati alla tecnica o al terreno della sterilità? Solo la ricerca potrà dare una risposta a questo quesito.

Credo di poter far mie molte delle conclusioni che ho riportato in questo documento. Anzitutto non ci sono ragioni sufficienti per sconsigliare l'uso delle tecniche di PMA alle coppie sterili. In secondo luogo, margini d'errore degli studi eseguiti sono generalmente molto elevati e di ciò non si può non tener conto.

Infine, invece di dividersi in modo così evidentemente ideologico (i medici cattolici dicono che tutti i bambini nascono ammalati, gli altri che non esistono problemi) si dovrebbe approfittare della stesura di linee guida per organizzare uno studio serio e meticoloso sui risultati.

Bibliografia

ANTHONY S, BUITENDIJK SE, DORREPAAL CA, LINDER K, BRAAT DDM e DEN OUDEN AL, Congenital malformations in 4224 children conceived after IVF. *Human Reproduction*, 17, 8, 2089-2095, 2002.

ASRM/SART, Assisted reproductive technology in the United States: 1999 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril*, 78, 918-931, 2002.

AUTORI VARI, A textbook of in vitro Fertilization and Assisted reproduction. Edito da P.R. Brinsden, The Parthenon Publishing Group, New York, 1999.

AUTORI VARI, Molecular Biology in Reproductive Medicine. Ed. da B.C.J.M. Fauser, The Parthenon Publishing Group, New York, 1999.

AUTORI VARI, Textbook of Assisted Reproductive Laboratory and Clinical Perspectives. Ed. da D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles e Z. Shoham. Martin Dunitz, Londra, 2001.

BONDUELLE M, CAMUS M, DE VOS A, STAESSEN C, TOURNAYE H, VAN ASSCHE E, et al., Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod*, 14 (Suppl.) 243-264, 1999.

BONDUELLE M, DEVROEY P, LIEBAERS I, VAN STEIRTEGHEM A, Commentary: Major defects are overestimated. *BMJ*, 315, 1265-1266, 1997.

BONDUELLE M, LEGEIN J, BUYSSE A, VAN ASSCHE E, WISANTO A, DEVROEY P, et al., Prospective follow-up study of 423 children born after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 11, 1558-1564, 1996.

BONDUELLE M, LIEBAERS I, DEKETELAERE V, DERDE MP, CAMUS M, DEVROEY P e 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 Reproduction*, 17, 3, 671-694, 2002.

BONDUELLE M, PONJAERT I, VAN STEIRTEGHEM A, DERDE M-P, DEVROEY P e LIEBAERS I, Developmental outcome at 2 years of age for children born after ICSI compared with children born after IVF. *Human Reproduction*, 18, 2, 342-350, 2003.

BONDUELLE M, VAN ASSCHE E, JORES H, KEIMOLEN K, DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEM A e LIEBAERS I, Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Human Reproduction*, 17, 10, 2600-2614, 2002.

BOWEN JR, GIBSON FL, LESLIE GL, SAUNDERS DM, Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, 351, 1529-34, 1998.

BREWAEYS A, Review: parent-child relationships and child development in donor insemination families. *Human Reproduction, Update*, 7, 1, 38-46, 2001.

BRUINSMA F, VENN A, LANCASTER P, et al., Incidence of cancer in children born after in vitro fertilization, *Hum Reprod*, 15:604-7, 2000.

COX GF, BURGER J, LIP V, MAU UA, SPERLING K, WU B et al., Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet*, 71, 162-164, 2002.

DeBAUN M, NIEMITZ EL, FEINBERG AP, Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am. J. Hum Genet*, 72, 156-160, 2003.

DeRYCKE M, LIEBAERS I and VAN STEIRTEGHEM A (2002) Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod* 17, 2487-2494.

DEVROEY P and VAN STEIRTEGHEM, A review of ten years experience of ICSI, *Hum Preprod*, 10, 1, 19-28, 2004

DUMOULIN JCM, COONAN E, BRAS M, BERGERS-JANSSEN JM, IGNOUL-VANVUCHELEN CM, VAN WISSEN LCP, et al., Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Hum Reprod*, 16, 306-312, 2001.

EDWARDS RG e BRODY SA, Principles and Pracice of Assisted Human Reproduction. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1995.

ERICSON A e KÄLLÉN B, Congenital malformations in infants born after IVF: a population-based study. *Human Reproduction*, 16, 3, 504-509, 2001.

ESRHE, Task Force on Intracytoplasmic Sperm Injection: Assisted reproduction by intracytoplasmic sperm inection: a survey on the clinical experience in 1994 children and the children born after ICSI, carried out until 31 December. *Hum Reprod*, 13, 1737-1746, 1998.

FLAMIGNI C, Il libro della procreazione. Arnoldo Mondadori Editore, Milano, 2002 (edizione aggiornata).

FLAMIGNI C, La procreazione assistita. Società editrice il Mulino, Bologna, 2002.

GERRIS J and VAN ROYEN E (2000) Avoiding multiple pregnancies in ART: a plea for single embryo transfer. *Hum Reprod* 15,1184-1188.

GISSLER M, KLEMETTI R, SEVON T, HEMMINKI E, monitoring of IVF birth outcomes in Filand: a data quality study, *BMC*, 4,3, 2004.

GOSEN R, TRASLER J, LUCIFERO D, FADDY M, rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology, *Lancet*, 361,1975-77, 2003.

GRIFFIN DK, HYLAND P, TEMPEST HG e HOMA ST, Safety issues in assisted reproduction technology. Should men undergoing ICSI be screened for chromosome abnormalities in their sperm? Human Reproduction, 18, 2, 229-235, 2003.

HANSEN M, KURINCZUK J, BOWER C, WEBB S, The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. N. Engl. J. Med., 346, 725-730, 2002.

IN'T VELD P, BRUNDENBURG H, VERHOEFF A, DHANT M, LOS F, Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. Lancet, 346, 773, 1995.

KOIVUROVA S, HARTIKAINEN AL, GISSLER M, HEMMINKI E, SOVIO V e JÄRVELIN MR, Neonatal outcome and congenital malformations in children born after in-vitro fertilization. Human Reproduction, 17, 5, 1391-1398, 2002.

KLIP H, BURGER J, LIP V, et al., Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. Am J Hum Genet, 71:162-4, 2002.

KURINCZUK JJ, BOWER C, Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. BMJ, 315, 1260-1264, 1997.

KURINKZUK JJ, Safety issues in assisted reproduction technology from theory to reality. Just what are the data telling us about ICSI off spring health and future fertility and should we be concerned? Human Reproduction, 18,5, 925-931, 2003.

LAMBERT RD, Safety issues in assisted reproduction technology. The children of assisted reproduction confront the responsible conduct of assisted reproductive technologies. Human Reproduction, 17, 12, 3011-3015, 2002.

LANSAC J. e ROYÈRE D, Follow-up studies of children born after frozen sperm donation. Human Reproduction Update, 7, 1, 33-37, 2001.

LESLIE G, COHEN FL, GIBSON FCM, et al., ICSI children have normal development at school age. 18th annual meeting of the ESHSE. Vienna: ESHRE, 2002: 3 (abstract).

LIEBAERS I, BONDUELLE M, VAN ASSCHE E, DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEIM A, Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. Lancet, 346, 1095, 1995.

LOFT A, PETERSON K, ERB K, MIKKELSEN AL, GRINSTED J, HALD F, et al., A Danish national cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994-1997. Hum Reprod, 14, 2143-2148, 1999.

LUDWIG M e KATALINIC A, Pregnancy course and health of children born after ICSI depending on parameters of male factor infertility. Human Reproduction, 18, 2, 351-357, 2003.

LUDWIG M, QUEIBER-LUFT A, KATALINIC A, Pregnancy and birth following ICSI: a prospective, controlled multicentric German trial [abstract no. O-35]. In: Fertility and Sterility Abstracts of the Scientific Oral and Poster Sessions. Orlando, F.L.: American Society for Reproductive Medicine, S14, 2001.

MAHER E, BRUETON L, BOWDIN S, LUHARIA A, COOPER W, COLE T, et al., Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J. Med. Genet.*, 40, 62-64, 2003.

MANNING M, LISSENS W, BOUNDUELLE M, CAMUS M, DE RIJCKE M, LIEBAERS I, et al., Study of DNA-methylation patterns at chromosome 15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects. *Mol Hum Reprod*, 6, 1049-1053, 2000.

MANNING M, LISSENS W, LIEBAERS I, VAN STEIRTEGHEM A, WEIDNER W, Imprinting analysis in spermatozoa prepared for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Int. J. Androl.*, 24, 87-94 2001.

MATTHEW G, RETZLOFF MD, and MARK D, HORNSTEIN MD, Is intracytoplasmic sperm injection safe? *Fertility and sterility*, Vol. 80, no. 4, october 2003.

MOLL AC, IMHOF SM, CRUYSBERG JR, et al., Incidence of retinoblastoma in children born after in vitro fertilisation. *Hum Reprod*, 15:604-7, 2000.

OLIVENNES F, FANCHIN R, LÉDÉE N, RIGHINI C, KADOCH IT e FRYDMAN R, Perinatal outcome and developmental studies on children born after IVF. *Human Reproduction*, 18, 2, 117-128, 2002.

OLIVENNES F, MANNAERTS B, STRUIJS, BONDUELLE M and DEVROEY P (2001) Perinatal outcome of pregnancy after GnRH antagonist (Ganirelix) treatment during ovarian stimulation for conventional IVF: a preliminary report. *Hum Reprod* 16,1588-1591

ORSTAVIK KH, EIKLID K, VAN DER HAGEN CB, et al., Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet*, 72,218-9, 2003.

PALERMO GD, NERI QV, HARIPRAESHOD JJ, DAVID OK, VEECK LL, ROSENWAKS Z, ICSI and its outcome. *Semin Reprod Med*, 18, 161-169, 2000.

PATRIZIO P, Intracytoplasmic sperm injection (ICSI): potential genetic concerns. *Hum Reprod*, 10, 2520-2523, 1995.

REIJO R, ALAGAPPAN RK, PATRIZIO P, Severe oligospermia resulting from microdeletions of azospermiafactor gene on Y chromosome. *Lancet*, 347, 1290-1293, 1996.

SCHIEVE L, MEIKLE S, FERRE C, PETERSEN H, JENG G, WILCOX L, Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N. Engl. J. Med.*, 346, 731-737, 2002.

SERAFINI P, Outcome and follow-up of children born after IVF-surrogacy. Human Reproduction Update, 7, 1, 23-27, 2001.

SIFES e MR, Percorsi diagnostico-terapeutici in medicina della riproduzione umana. A cura di C. Flamigni e M.E. Coccia, Viviani editore, Roma, 2003.

SILVER RI, RODRIGUEZ R, CHANG TS, GEARHART JP, In vitro fertilization is associated with an increased risk of hypospadias. Urology, 161, 1954-1957, 1999.

SIMERLY C, WU GJ, ZOAN S, ORD T, RAWLINS R, JONES J, NAVARA C, GERRITY M, RINEHART J and BINOR Z (1995) The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center in humans and implications for fertility. Nat Med 1,47-52

SÖDERSTRÖM-ANTTILA V, Pregnancy and child after oocyte donation. Human Reproduction Update, 7,1, 28-32, 2001.

STUDY GROUP OF BRUSSELS, GOTHENBURG AND NEW YORK (2002) Medical and psychological follow-up of five-year old ICSI children. Global Conference Bertarelli Foundation Oral communication, November 16-17, Prague.

SUTCLIFFE AG, BONDUELLE M, TAYLOR BW, To the editor. N. Engl. J. Med., 347, 1450, 2002.

SUTCLIFFE AG, D'SOUZA SW, CADMAN J, RICHARDS B, McKINLAY IA, LIEBERMAN B, Minor congenital anomalies, major congenital malformations and development in children conceived from cryopreserved embryos. Hum Reprod, 10, 3332-3337, 1995.

SUTCLIFFE AG, D'SOUZA SW, CADMAN J, RICHARDS B, McKINLAY IA and LIEBERMAN B, Outcome in children conceived from cryopreserved embryos. Arch Dis Child 72, 290-293.

SUTCLIFFE AG, TAYLOR B, THORNTON S, GRUDZINSKAS JF, LIEBERMAN BA, Children born after intracytoplasmic injection: population control study. BMJ, 328, 704-705, 1999.

TIITINEN A, HALTTUNEN M, HARKKI P, VUORISTO P and HYDEN-GRANSKOG C (2001) Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation. Hum Reprod 16,1140-1144.

THOMPSON JG, KIND KL, ROBERTS CT, ROBERTSON SA e ROBINSON JS, Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies. Short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? Human Reproduction, 17, 11, 2783-2786, 2002.

VAN STEIRTEGHEM A, BONDUELLE M, DEVROEY P and LIEBAERS I, Follow-up of children born after ICSI. Human Reproduction Update, 8, 2, 111-116, 2002.

VAN STEIRTEGHEM A, BONDUELLE M, LIEBAERS I e DEVROEY P, Children born after assisted reproductive technology. American Journal of Perinatology, 19, 2, 59-65, 2002.

WENNERHOLM UB, BERGH C, HAMBERGER L, LUNDIN K, NILSSON L, WIKLAND M, et al., Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. Hum Reprod, 15, 944-948, 2000.

WENNERHOLM UB, BERGH C, HAMBERGER L, NILSSON L, REISMER E, WENNERGREN M, et al., Obstetric and perinatal outcome of pregnancies following intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 11, 1113-1119, 1996.

WESTERGAARD HB, TRANBERG JOHANSEN AM, ERB K e NYBOE ANDERSEN A, Danish National in-vitro Fertilization Registry 1994 and 1995: A controlled study of byrths, malformations and cytogenetic findings. Human Reproduction, 14, 7, 1896-1902, 1999.

WISANTO A, MAGNUS M, BONDUELLE M, LIU J, CAMUS M, TOURNAYE H, et al., Obstetric outcome of 424 pregnancies after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 10, 2713-2718, 1995.

WITTEMER C, MACHEV N, VIVILLE STEPHAN, Les enfants de l'ICSI sous la loupe. Médecine sciences, Vol. 20, n. 3, Mars 2004

YOUNG LE, FERNANDES K, McEVOY TG, BUTTERWITH SC, GUTIERREZ CG, CAROLAN C, BROADBENT PJ, ROBINSON JJ, WILMUT I and SINCLAIR KD (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. Nat Genet 27,153-154