

Artigo Original/Original Article

Gestações gemelares após PMA versus gestações gemelares espontâneas: avaliação comparativa das complicações obstétricas e dos resultados neonatais

Obstetrical complications and neonatal outcome in multiple gestations: assisted reproduction versus spontaneous conception

Sofia Figueiredo*, Teresa Dionísio**, Dolores Faria***, Maria do Ceu Almeida****, Bárbara Oliveira*****, Isabel Santos Silva*****

Maternidade Bissaya Barreto - Coimbra

ABSTRACT

Introduction and objective - There is ample evidence that singletons born after assisted reproductive technology (ART) have more obstetrical complications and poorer neonatal outcomes when compared with their spontaneously conceived (SC) counterparts. Similar comparisons for twins show conflicting results. The aim of this study was to evaluate perinatal and neonatal outcomes in ART versus SC twins.

Study design - Retrospective case-control study.

Population and Methods - A total of 234 twins born in our hospital between 2006 and 2008 were studied, 70 from ART and 164 from SC pregnancies. Their clinical files were reviewed to extract information on the main obstetrical complications and neonatal outcomes.

Results - Compared with SC twins, ART twins were more likely to be born to older, primiparous mothers. They were at increased risk of preterm birth <35 weeks (22.9% versus 17.1%; $p=0.024$) and were more likely to be delivered by cesarean section (57.1% versus 37.2%; $p=0.000$). ART twins had a higher risk of adverse perinatal outcomes, including low birthweight (2056 grammes versus 2249 grammes; $p=0.029$) and neonatal intensive care unit admission (44.3% versus 26.2%; $p=0.003$).

Conclusions - Twin pregnancies resulting from ART are at a higher risk of obstetrical complications and adverse perinatal risks than those which are spontaneously conceived.

Keywords: assisted reproductive technology; twins; neonatal outcome

*Interna de Ginecologia e Obstetrícia, Maternidade Bissaya Barreto, Centro Hospitalar de Coimbra

** Interna de Cardiologia Pediátrica, Hospital Pediátrico de Coimbra, Centro Hospitalar de Coimbra

*** Assistente Hospitalar Graduada de Pediatria, Unidade de Cuidados intensivos Neonatais, Maternidade Bissaya Barreto, Centro Hospitalar de Coimbra

**** Chefe de Serviço de Obstetrícia, Maternidade Bissaya Barreto, Centro Hospitalar de Coimbra

***** Assistente no Instituto de Biofísica e Biomatemática, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Investigadora do Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem

***** Assistente Hospitalar Graduada de Obstetrícia, Maternidade Bissaya Barreto, Centro Hospitalar de Coimbra

INTRODUÇÃO

Em 2009, os resultados apresentados pela *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) revelam que 21,8% das gestações obtidas com recurso a técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA) são múltiplas¹. Neste grupo, 21% correspondem a gestações bifetais e 0,8% a gestações triplas. Apesar das disparidades importantes verificadas entre os vários países europeus, decorrentes em grande parte de um sistema de comparticipação muito díspar, a taxa de gemelaridade associada às técnicas de PMA mantém-se globalmente elevada. Em contrapartida, estudos epidemiológicos demonstraram que a taxa de gemelaridade inerente à gravidez espontânea não ultrapassa 1,5%².

Vários estudos populacionais evidenciaram uma correlação entre as gestações unifetais conseguidas por técnicas de PMA e uma incidência acrescida de complicações obstétricas bem como uma morbidade e mortalidade perinatais aumentadas^{4,5}. Verifica-se, neste grupo, uma frequência acrescida de hipertensão gestacional, parto pré-termo, baixo peso ao nascer, malformações congénitas e parto por cesariana^{6,7,8}. No contexto das gestações gemelares espontâneas, esta associação não é evidente existindo resultados contraditórios quanto ao impacto nefasto da PMA na evolução e no desfecho destas gestações^{2,3,9,10,11}.

O principal objectivo deste estudo foi avaliar e comparar as complicações obstétricas e os resultados neonatais nas gestações gemelares resultantes de técnicas de PMA e nas gestações gemelares espontâneas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os autores realizaram um estudo retrospectivo, caso-controlo, pela avaliação dos processos clínicos de todas as gestações gemelares cujo parto ocorreu na Maternidade Bissaya Barreto de 1 de Janeiro de 2006 a 31 de Dezembro de 2008.

Neste período, registaram-se 144 gestações gemelares, das quais 142 correspondiam a gestações gemelares e duas a gestações triplas. Foram excluídas do estudo as gestações triplas e monocoriónicas, sendo apenas consideradas 117 gestações gemelares bicoriónicas. A corionicidade foi determinada pela ecografia do 1º trimestre

e, posteriormente, confirmada pelo estudo macroscópico e histológico das placentas e membranas ovulares.

Consideraram-se dois grupos: um primeiro constituído pelas gestações gemelares conseguidas por técnicas de PMA (grupo caso). Neste grupo, apenas foram incluídas as gestações resultantes de procedimentos de *Fecondation in Vitro* (FIV) e *Intracytoplasmatic Sperm Injection* (ICSI) tendo sido excluídas as gestações obtidas com indutores de ovulação (citrato de clomifeno, FSH urinário e recombinante) associados ou não a inseminação intra-uterina. O segundo grupo corresponde às gestações gemelares espontâneas (grupo controlo).

Foram estudados diversos parâmetros: dados epidemiológicos (idade materna, gesta e para), complicações obstétricas, idade gestacional do parto, tipo de parto, peso dos recém-nascidos, índice de APGAR, necessidade de internamento na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais (UCIN), malformações congénitas, morbidade e mortalidade perinatais.

Consideramos discrepância de crescimento fetal, uma diferença no percentil da estimativa de peso fetal entre o par igual ou superior a 20%. De acordo com vários autores e estudos epidemiológicos efectuados em gestações múltiplas, o parto foi considerado pré-termo quando ocorreu antes das 35 semanas¹². Definimos como alteração do líquido amniótico a identificação de um oligoâmnios (maior loca ≤ 2 cm ou índice de líquido amniótico ≤ 5 cm) ou de um hidrâmnios (maior loca ≥ 8 cm ou índice de líquido amniótico ≥ 25 cm). Foram classificadas como complicações hipertensivas o diagnóstico de hipertensão gestacional, de pré-eclâmpsia, de eclâmpsia e de síndrome de HELLP. Definimos como restrição de crescimento fetal uma estimativa de peso fetal inferior ao percentil 10 para a idade gestacional.

A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa Statistical Packages for Social Science-16 for Windows®. Aplicaram-se os testes de qui-quadrado ou a prova exacta de Fisher para a análise das variáveis qualitativas. A análise das variáveis quantitativas foi efectuada através da correlação de Pearson e do teste T de Student para variáveis independentes sempre que aquelas seguiam distribuição normal, ou do teste de Mann-Whitney no caso con-

Quadro 1: Dados epidemiológicos

	Gestações após PMA n=35	Gestações espontâneas n= 82	p
Idade materna* (média ±dp)	34.1 ±4.3	30.7 ±4.	<0.001
Gesta**			
1	27 (77.1%)	36 (43.9%)	<0.001
2	2 (5.8%)	27 (32.9%)	<0.001
3+	6 (17.1%)	19 (23.2%)	<0.001
Para**			
0	32 (91.4%)	40 (48.8%)	<0.001
1	2 (5.7%)	34 (41.5%)	<0.001
2+	1 (2.9%)	8 (9.7%)	<0.001

* Teste t-Student
** Teste Qui-quadrado

Quadro 2: Complicações obstétricas

	Gestações após PMA n=35	Gestações espontâneas n= 82	P
Complicações hipertensivas*	10 (28.6%)	7 (8.5%)	<0.001
Discrepância de crescimento*	9 (25.7%)	11 (13.4%)	0.037
Metrorragia*	1 (2.9%)	2 (2.4%)	0.864
Alteração do LA*	0 (0%)	3 (3.7%)	0.182
APPT/RPPM*	12 (34.3%)	33 (40.2%)	0.382

* Teste Qui-quadrado
Legenda: APPT – Ameaça de parto pré-termo, RPPM – Rotura prematura pré-termo de membranas

trário, ou quando a variável dependente era ordinal. Aplicou-se ainda o modelo de regressão logística para identificar ou excluir possíveis preditores de complicações. Todos os testes estatísticos foram avaliados ao nível de significância de 0.05.

RESULTADOS

Foram avaliadas 117 gestações gemelares, 35 obtidas com recurso a técnicas de FIV/ICSI e 82 espontâneas.

Entre os dois grupos, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas no que se refere à idade materna, ao número de gestações e à paridade (Quadro 1). No quadro 2, são apresentadas as complicações obstétricas registadas nos dois grupos. Verificamos uma diferença estatisticamente significativa nas complicações hipertensivas (28.6% *versus* 8.5%; $p=0.000$) e na discrepância de crescimento (25.7% *versus* 13.4%; $p=0.037$), com predomínio destas complicações no grupo das gestações após PMA. Neste grupo, o modelo de regressão logística mos-

tra que a idade influencia a ocorrência de HTA ($p = 0.07$). Quanto à maior ocorrência de discrepância de crescimento entre os co-gêmeos no grupo das gestações resultantes de técnicas de PMA, a influência da idade não se comprova do ponto de vista estatístico ($p = 0.055$).

A rotura prematura pré-termo de membranas e a ameaça de parto pré-termo bem como a alteração do líquido amniótico ocorreram com menor frequência nas gestações gemelares após PMA, sendo estas diferenças desprovidas de significado estatístico.

A mediana da idade gestacional à data do parto foi sobreponível nos dois grupos, não existindo diferença estatística.

O parto pré-termo predominou nas gestações obtidas após PMA (22.9% *versus* 17.1%; $p=0.024$), sendo esta diferença estatisticamente significativa. Verificamos que esta diferença diminui com o aumento da IG, sendo mais importante quando a $IG \leq 32$ semanas.

Quanto ao tipo de parto, verificou-se uma maior taxa de parto por cesariana nas gestações após PMA

Quadro 3: Idade gestacional do parto e tipo de parto

	Gestações após PMA n=35	Gestações espontâneas n=82	P
IG (sem) (mediana – Min. e Max.)*	36 (28-38)	36 (27-38)	0.898
Prematuridade**			
IG <35 semanas	8 (22.9%)	14 (17.1%)	0.024
32 < IG < 35 semanas	4 (11.4%)	10 (12.2%)	0.036
IG ≤ 32 semanas	4 (11.4%)	4 (4.9%)	0.0002
Via do parto**			
Parto vaginal	30 (42.9%)	103 (62.8%)	<0.001
Cesariana	40 (57.1%)	61 (37.2%)	<0.001

* Teste de Mann-Whitney
 ** Teste Qui-quadrado
 Legenda: IG – Idade gestacional, sem. – semanas, Min. – mínima, Max. - maximo

Quadro 4: Resultados neonatais

	Gestações após PMA n=70	Gestações espontâneas n=164	P
Peso do RN (gramas) (média ±dp)*	2056 ± 662	2249 ± 432	0.029
Peso dos RN ≤ 1500 gramas**	16 (23.5%)	8 (5.0%)	0.072
1500 g < Peso dos RN ≤ 2500 g**	31 (45.6%)	103 (64.0%)	0.443
Peso dos RN < 2500 g**	21 (30.9%)	50 (31.1%)	0.200
APGAR ao 5º minuto (mediana – min e max)***	10 (6-10)	10 (0-10)	0.999

* Teste t-Student
 ** Teste Qui-quadrado
 *** Teste de Mann-Whitney
 Legenda: RN – recém-nascido, UCIN – unidade de cuidados intensivos neonatais, NS – não significativo

(57.1% versus 37.2%; p=0.000), tendo esta diferença significativo estatístico (Quadro 3).

O peso médio dos recém-nascidos foi, do ponto de vista estatístico, significativamente menor no grupo dos gêmeos concebidos com recurso a técnicas de PMA (2056 gramas versus 2249 gramas; p=0.029). Contudo, não existe diferenças quanto à proporção de RN de extremo, muito baixo e baixo peso entre os dois grupos (Quadro 4).

Não se registaram diferenças quanto ao índice de APGAR dos recém-nascidos ao 5º minuto de vida (Quadro 4).

Face à existência de uma grande variação nas idades gestacionais à data do parto, avaliou-se o peso do recém-nascido padronizado ao tempo de gestação, ou seja, considerou-se o peso do recém-nascido em gramas e por semana de gestação. Verificou-se que este não varia consoante o tipo de gestação (p= 0.105),

sendo de 61.4 ± 13.5 gramas/semana no grupo das gestações após PMA e de 63.9 ± 9.9 gramas/semana de gestação quando a gravidez é espontânea.

No quadro 5, compara-se o peso médio dos recém-nascidos entre os dois tipos de gestação em função da IG (IG ≤32 semanas, 32 <IG ≤35 semanas e IG>35 semanas). Verificou-se que o peso médio dos recém-nascidos é idêntico entre os dois grupos desde que sejam atingidas as 32 semanas de gestação.

A morbidade do recém-nascido está descrita no Quadro 6. A proporção de recém-nascidos com necessidade de internamento na UCIN foi superior no grupo dos recém-nascidos das gestações após PMA (44.3% versus 26.2%; p=0.003), com significado estatístico. A doença de membranas hialinas, a taquipneia do recém-nascido, a hiperbilirubinemia, a sepsis e a hemorragia intra-ventricular ocorreram com maior frequência no grupo dos recém-nascidos das

Quadro 5: Peso dos recém-nascidos em função da idade gestacional

	Gestações após PMA n=70	Gestações espontâneas n=164	P
IG ≤32 semanas (gramas) (média ±dp)*	1196.2 + 186.8	1591.8 + 411.8	0.004
32<IG ≤35 semanas (gramas)(média ±dp)*	2085.2 + 386.6	2079.8 + 329.8	0.914
IG > 35 semanas (gramas) (média ±dp)*	2569.4 + 249.7	2485.8 + 316.0	0.066

* Teste t-Student

Legenda: IG – Idade gestacional

Quadro 6: Morbilidade e mortalidade perinatais

	Gestações após PMA n=70	Gestações espontâneas n=164	P
Internamento na UCIN*	31 (44.3%)	43 (26.2%)	0.003
Doença de membranas hialinas*	4 (5.7%)	2 (1.2%)	0.067
Taquipneia transitória do RN*	6 (8.6%)	7 (4.3%)	0.160
Hiperbilirubinemia*	14 (20.0%)	27 (16.5%)	0.317
Sepsis*	1 (1.4%)	1 (0.6%)	0.505
Hemorragia intra-ventricular*	1 (1.4%)	0 (0.0%)	0.456
Mortalidade perinatal*	1 (1.5%)	2 (1.2%)	0.574

* Teste Qui-quadrado

Legenda: UCIN – unidade de cuidados intensivos neonatais

gestações após PMA, não sendo estas diferenças estatisticamente significativas.

No grupo das gestações após PMA, foi diagnosticada uma anomalia cromossómica (46 XX, inv (1)) num feto e um defeito aberto do tubo neural com malformação de Arnold-Chiari noutro feto. Ambas as malformações justificaram a realização de uma interrupção médica selectiva dos fetos afectados. No grupo das gestações espontâneas, registaram-se três casos de anomalias congénitas: um feto portador de uma doença metabólica, outro com displasia renal e um recém-nascido com síndrome de Down. Os dois primeiros casos – doença metabólica e displasia renal – justificaram a realização de um feticídio selectivo.

A mortalidade perinatal não foi estatisticamente diferente nos dois grupos (1.5% *versus* 1.2%, p=0.07). Registou-se uma morte *in utero* às 28 semanas no grupo das gestações após PMA e duas mortes no grupo das gravidezes espontâneas (uma morte *in útero* às 30 semanas e outra no período intra-parto às 38 semanas).

DISCUSSÃO

O impacto das técnicas de PMA na evolução das gestações gemelares e nos resultados perinatais não é consensual na literatura. Para Boulet et al.², as técnicas de FIV/ICSI não estão associadas a um desfecho perinatal adverso, verificando-se neste grupo um menor risco de parto pré-termo e de baixo peso ao nascer em comparação com gestações gemelares espontâneas. As conclusões de Moise et al.¹³ vão no sentido oposto, estabelecendo um risco acrescido de parto pré-termo e de baixo peso ao nascer associado às gestações gemelares após PMA. Estes resultados aparentemente discordantes podem, em parte, ser justificados pelas diferenças de metodologia dos diversos trabalhos nomeadamente quanto à limitação ou não do estudo às gestações bicoriónicas.

É actualmente consensual que a gravidez gemelar monocoriónica está associada a uma aumento significativo da morbilidade e mortalidade perinatais, decorrente das complicações específicas inerentes a este tipo de placentação¹⁴. Na população caucasiana, a proporção de gestações monocoriónicas correspon-

de a 22% das gestações espontâneas^{15,16}. A incidência deste tipo de placentação não ultrapassa os 2% no contexto das gestações múltiplas após PMA. Logicamente, a maior proporção de gestações monocoriónicas associada à gravidez espontânea condiciona resultados mais favoráveis, em termos de complicações obstétricas e resultados perinatais, no grupo das gestações após PMA.

Do ponto de vista epidemiológico, a idade materna média é mais avançada no grupo das gestações após PMA existindo também uma maior proporção de nulíparas neste grupo. As características demográficas da nossa amostra, sobreponíveis aos dados da literatura^{2,3,17}, explicam-se pelo percurso terapêutico habitualmente longo do casal infértil até conseguir uma gravidez.

No que se refere às complicações obstétricas, o nosso estudo aponta para a incidência acrescida de complicações hipertensivas no grupo das gestações após PMA. Nesta população, Lynch et al.¹⁸ e Hernandez-Diaz et al.¹⁹ também documentaram a existência de um risco aumentado de hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia. O modelo de regressão logística aplicado para identificar potenciais preditores de complicações indica que a idade constitui um factor de risco independente para a ocorrência de complicações hipertensivas no grupo das gestações gemelares resultantes de técnicas de PMA. Neste contexto e tal como previamente estabelecido por Fitzsimmons et al.²⁰, a maior incidência de complicações hipertensivas nesta população não está associada às técnicas de PMA.

Como Pinborg et al.²¹, encontramos uma maior incidência de discrepância de crescimento entre os co-gêmeos no grupo das gestações após PMA. Neste caso, o modelo de regressão logística aplicado não comprovou a influência da idade nesta tendência de crescimento, não sendo possível excluir a influência das técnicas de PMA no padrão de crescimento fetal. Vários estudos genéticos parecem confirmar o impacto das técnicas de FIV/ICSI no crescimento fetal. Estes trabalhos sugerem que estas técnicas estão na origem de erros de *imprinting* de genes importantes no crescimento fetal, nomeadamente o gene IGF-2²².

O nosso estudo conclui que as técnicas de PMA aumentam globalmente o risco de parto pré-termo.

No entanto e à semelhança de outros autores^{11,21}, verificamos que a PMA está essencialmente associado a um aumento do risco de grande prematuridade ($IG \leq 32$ semanas).

A maior proporção de parto por cesariana no grupo das gestações após PMA é consensual na literatura^{2,11,21}. A idade materna mais avançada e a maior taxa de nuliparidade são apontados como elementos de explicação para esta realidade. Para Koudstaal et al.⁶, a noção subjectiva de maior segurança inerente a um parto por cesariana contribuirá também para a elevada taxa de cesariana electiva nesta população (“*the safety first approach*”).

Apesar do peso médio dos RN ser inferior no grupo das gestações após PMA, não existe risco acrescido de baixo peso (< 2500 g), de muito baixo peso (1500 g < peso dos RN \leq 2500 g) e de extremo baixo peso ao nascer (<1500 g) neste grupo. A diferença encontrada quando se analisam os pesos dos recém-nascidos até às 32 semanas de gestação pode ser imputada à menor proporção de partos até às 30 semanas no grupo das gestações espontâneas. De facto, registaram-se 19.2% de partos até às 30 semanas em gestações após PMA enquanto que a proporção de partos até às 30 semanas é de apenas 4.9% no grupo das gestações espontâneas. Tal como outros autores, verificamos que as técnicas de PMA não estão associadas a um risco acrescido de baixo peso ao nascer²¹.

A maior prevalência de internamento na UCIN no grupo dos RN das gestações após PMA está de acordo com os dados da literatura^{3,11,21}. Os nossos resultados explicam-se pela IG média na altura do parto inferior à verificada para os RN das gestações espontâneas bem como à maior proporção de partos antes das 30 semanas neste grupo. Relativamente às restantes complicações neonatais não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos, sendo estes resultados concordantes com os descritos na literatura.

A dimensão da nossa amostra não permite retirar conclusões relativas à prevalência de anomalias congénitas nem à taxa de morte perinatal nos dois grupos. No entanto, tal como sugerido por vários autores¹⁰, as técnicas de PMA parecem estar associadas a um risco acrescido de anomalias congénitas.

CONCLUSÕES

Os nossos resultados sugerem uma maior necessidade de internamento na UCIN dos RN das gestações resultantes de técnicas de PMA não sendo possível afirmar, de forma indiscutível, o impacto nefasto destas técnicas na ocorrência de complicações obstétricas. Neste contexto, e face aos elevados custos sócio-económicos envolvidos, as equipas clínicas dedicadas à infertilidade em conjunto com os casais devem privilegiar, sempre que possível, a transferência monoembrionária^{23,24}.

BIBLIOGRAFIA

1. Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG, The European IVF-monitoring (EIM) Consortium for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2009;24(6):1267-1287.
2. Boulet S, Schieve L, Nannini A, Ferre C, Devine O et al. Perinatal outcomes of twin births conceived using assisted reproduction technology: a population-based study. *Hum Reprod* 2008;23(8):1941-1948.
3. Hansen M, Colvin L, Petterson B, Kurinczuk J, de Klerk N and Bower C. Twins born following assisted reproductive technology: perinatal outcome and admission to hospital. *Hum Reprod* 2009;24(9):2321-2331
4. Jackson PA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2004;103:551-563. □
5. Mc Donald SD, Murphy K, Beyene J, Ohisson A. Perinatal outcomes of singleton pregnancies achieved by in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 2005;27:449-459
6. Koudstaal J, Braat D, Bruinse H, Naaktgeboren N et al. Obstetric outcome of singleton pregnancies after IVF: a matched control study in four Dutch university hospitals. *Hum Reprod* 2000;15(8):1819-1825.
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* 2005;20:328-338
8. Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama KP. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformations rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:437-443.
9. Koivurova S, Hartikainen AL, Gissler M, Hemminki E, Sovio U and Jarvelin MJ. Neonatal outcome and congenital malformations in children born after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2002;17(5):1391-1398
10. Helmerhorst F, Perquin D, Donker D, Keirse M. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ* 2004;328(7434):261-266.
11. Mc Donald SD, Murphy K, Beyene J, Ohisson A. Perinatal outcomes of in vitro fertilization twins: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:141-152
12. Luke B, Minogue J, Witter F. The ideal pregnancy: patterns of weight gain, discordance and length of gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:588-97.
13. Moise J, Laor A, Armon Y, Gur I and Gale R. The outcome of twin pregnancies after IVF. *Human Reproduction* 1998;13(6):1702-1705.
14. Derom R, Derom C. The east flandres prospective twin survey. In: Keith LG, Blickstein I (eds). *Multiple pregnancy:epidemiology, gestation and perinatal outcome*. London: Taylor and Francis, 2005, 39-47.
15. Derom R, Derom C. Placentation. In: Keith LG, Blickstein I (eds). *Multiple pregnancy:epidemiology, gestation and perinatal outcome*. London: Taylor and Francis 2005:157-167.
16. Rodrigues C, Branco M, Ferreira I, Nordesre A, Fonseca M, Taborda A, Silva I, Almeida MC. Epidemiologia da gestação múltipla: Casuística de 15 anos. *Acta Med Port* 2005;18:107-111.
17. McDonald S, Zhen H, Mulla S, Ohlsson A, Beyene J, Murphy K. Preterm birth and low birth weight among in vitro fertilization twins: A systematic review and meta-analyses. *European Journal of Obstetrics & gynecology and Reproductive Biology* 2010;148:105-113.
18. Lynch A, McDuffie R, Murphy J, Faber K and Orleans M. Preeclampsia in multiple gestation: The role of assisted reproductive technologies 2002;99(3):445-451
19. Hernandez-Diaz S, Werler M and Mitchell A. Gestational hypertension in pregnancies supported by infertility treatments: role of infertility, treatments, and multiple gestations. *Fertility and Sterility* 2007;88(2):438-445
20. Fitzsimmons BP, Bebbington MW, Fluker MR. Perinatal and neonatal outcomes in multiple gestations: assisted reproduction versus spontaneous conception. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1162-1167.
21. Pinborg A, Loft A, Rasmussen S, Schmidt L, Langhoff-Roos J, Greisen G and Andersen AN. Neonatal outcome in a Danish national cohort of 3438 IVF/ICSI and 10 362 non-IVF/ICSI twins born between 1995 and 2000. *Human Reproduction* 2004;19(2):435-441.
22. Li T, Vu T, Ulaner G, Littman E, Ling JQ et al. IVF results in *de novo* DNA methylation and histone methylation at an *Igf2-H19* imprinting epigenetic switch. *Molecular Human Reproduction* 2005;11(9):631-640.
23. Fauque P, Jouannet P, Davy C, Guibert J, Viallon V et al. Cumulative results including obstetrical and neonatal outcome of fresh and frozen-thawed cycles in elective single versus double fresh embryo transfers. *Fertil Steril* 2009 May 14.
24. Leniaud L, Poncelet C, Porcher R, Martin-Pont B, Cédric-Durnerin I, Hugues JN, Wolf JP and Sifer C. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer following in vitro fertilization: A two-year French hospital experience. *Gynecol Obstet Fertil* 2008;36:159-165.