

RIESGOS PARA LA SALUD DE LOS NACIDOS POR LAS TÉCNICAS DE FECUNDACIÓN ASISTIDA. LA PUNTA DE UN ICEBERG

Contenido

1. Genes y medio: mutaciones epigenéticas como una de las causas de alteraciones de salud de los generados por las TRA
Epigenoma y mutaciones epigenéticas
Influencia del medio en los procesos de la transmisión de la vida
El estado de los gametos: epimutaciones
Fecundación
Epimutaciones por el cultivo del embrión
La congelación de los embriones y su posterior transferencia
2. Estudios sistemáticos comparativos de la salud según modo de ser concebidos
Embarazos múltiples
Bajo peso en relación a la edad gestacional
Parálisis cerebral, epilepsia y ataques febriles
Principales causas
3. Malformaciones, alteraciones cromosómicas y herencia de la esterilidad
Malformaciones
Alteraciones cromosómicas
Herencia de las alteraciones que provocan esterilidad paterna, tras el uso de la ICSI
4. Defectos del feto temprano
5. Síndromes raros, y riesgo de cáncer por mutaciones epigenéticas
6. Epimutaciones en el genoma originadas por el uso de las TRA que se manifiestan a largo plazo y/o se transmiten a las siguientes generaciones.
Problemas cardiovasculares por la aplicación de las TRA
Otras epimutaciones

Cuando en 1978 nace la primera niña generada por fecundación *in vitro* (FIV) surge inevitablemente la pregunta: ¿Tendrá los mismos riesgos de salud que los concebidos «naturalmente»?

En el caso de Louise Brown no había razones por las que temer que padeciera ningún problema a consecuencia de la esterilidad de sus padres, cuyos gametos –óvulos y espermatozoides– no eran defectuosos. Se trataba simplemente de una obstrucción de las trompas de Falopio de la madre. No fue un embarazo múltiple, ni fue cultivada o congelada en su etapa embrionaria, sino pronto transferida al útero de su madre.

No obstante, a partir de ese momento el Medical Research Council empezó a comparar los datos del primer año de vida de los nacidos por FIV a lo largo de 10 años, respecto a los nacidos en el mismo periodo de tiempo y que habían sido engendrados naturalmente. Ya entonces se encuentra un déficit de salud de los generados por la FIV.

La cuestión del déficit de salud de los niños nacidos por las técnicas de reproducción asistida (TRA) ha sido muy controvertida. Los primeros estudios comparativos se centraron en las diferencias, en algún tipo de alteración –prematurnidad, malformaciones, alteración cromosómica, etc.–, según el modo en que habían sido concebidos. El tamaño de las

muestras era insuficiente para un análisis estadístico riguroso, dada la variedad de características tanto en lo que se refiere a las causas de esterilidad de los progenitores, como al tipo de técnica empleada, o a que se hayan sometido o no a congelación los gametos o el embrión mismo. También varía según el tipo de embarazo resultante –múltiple o simple–, edad de la madre, etc. Los niños control, de la misma edad, zona geográfica, etnia, etc., también tienen características variadas.

Hacia los años 2003 y 2005, se llevan a cabo meta-análisis, que recogen datos de numerosos estudios, que ponen de manifiesto un incremento del riesgo por la aplicación creciente de las técnicas, y comienza un tenue debate acerca de cuáles podrían ser las causas. Los diferentes estudios dan aumento de riesgo en los nacidos por aplicación de las técnicas, que a veces resulta estadísticamente significativo y otras no. Algunos no muestran diferencia alguna¹ e incluso en algún caso resultan aparentemente con menor riesgo para la salud de los nacidos². La realidad

1 Hansen, M., Bower, C., Milne, E., de Klerk, N., Kurinczuk, J.J. «Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review». *Human Reproduction* 20, 2005, 328–338.

2 De Neubourg, D., Gerris, J, Mangelschots, K, *et al.* «The obstetrical and neonatal outcome of babies born after single-embryo transfer in IVF/ICSI compares favorably to spontaneously conceived babies». *Human Reproduction* 21, 2006, 1041–1046.

de esa mejor salud resultó ser otra: cuando los embriones son congelados, y posteriormente descongelados, sólo llegan a implantarse en el útero, desarrollarse y nacer, aquellos que son más fuertes, menos dañados y por tanto capaces de resistir el proceso³.

Durante años se ha debatido sobre si los problemas de salud, evidentemente mayores en los niños generados por las TRA, se deben al estado de los gametos de los progenitores, o a las técnicas. La recogida de datos se complica con la donación de gametos cuando la causa de infertilidad es factor masculino, o la edad de la mujer es avanzada.

La creciente propaganda de uso de gametos *donados* por otras personas ajenas a la pareja se hace bajo un supuesto falso: las TRA son muy eficientes y seguras, el problema para el hijo será la infertilidad subyacente de los que, precisamente por ello, acuden a los centros de reproducción asistida, para tener un hijo.

Es una falacia la disyuntiva de plantear si «la culpa» es de los progenitores con problemas de salud reproductiva, o es de las técnicas. Las TRA nacen precisamente para saltar las barreras de la esterilidad y, por tanto, parten de la existencia de un problema. La práctica clínica de las TRA está diseñada para suplir la ineficiencia natural de quienes padecen alguna forma de infecundidad o esterilidad, por lo que se ha de *forzar*

artificialmente la capacidad fecundante de los gametos, fecundarlos y mantener el embrión fuera del entorno natural, durante unos días.

Con el tiempo, la proliferación de estudios con muestras amplias y controles adecuados, que permiten un buen tratamiento estadístico de los datos, ha desechado dudas acerca de los efectos negativos propios de las TRA. Y al mismo tiempo se confirma que tanto el estado de los gametos como las técnicas empleadas en la reproducción artificial causan los trastornos en la descendencia, con distinta participación según el tipo de trastorno.

Un ciclo típico de las TRA se inicia con una estimulación ovárica, habitualmente hormonal, incluso cuando la fecundación va a ser natural o por inseminación. En el caso de la FIV, a continuación de la estimulación se realiza la recogida de los folículos ováricos de los oocitos y con frecuencia se les induce a madurar *in vitro*. Los gametos se co-incuban entonces en un medio de cultivo durante unas horas (FIV), o un solo espermatozoide se inyecta directamente en el oocito en cultivo para ayudar la fecundación (ICSI). El embrión resultante se cultiva durante 2 a 3 días hasta que se forma el embrión de 6-8 células, o durante varios días más, hasta alcanzar el estado de blastocisto (70-100 células), antes de proceder a la implantación en el útero de la madre. Esta transferencia se hace entonces, o después de un periodo de conservación en frío y posterior descongelación, que ha de ir acompañada de una reanimación del embrión.

3 Mangelschots, K.J, *et al.* «The obstetrical and neonatal outcome of babies born after single-embryo transfer in IVF/ICSI compares favourably to spontaneously conceived babies». *Human Reproduction* 21, 2006, 1041-1046.

Estos eventos «in vitro» ocurren durante el período más crítico del desarrollo del embrión naciente, alrededor de su anidación. El cambio del medio natural –cuerpo de la madre– por los diferentes medios de las técnicas, no son indiferentes ni para el oocito ni para el embrión⁴. Desde hace años, la Biología del desarrollo ha demostrado que la expresión de los diferentes genes es dependiente del medio en que se encuentran las células, respecto a su posición en relación con las células con las que interactúan, las señales moleculares que reciben, y el medio ambiente en que vive el organismo, sea el cuerpo materno o sean las condiciones externas en las que vive tras su nacimiento.

Es importante tener en cuenta este hecho: el medio modifica el estado del material genético, regulando así –epigenéticamente– la expresión genética. Y, es importante, lógicamente, que las técnicas –con sus cambios de medio ambiente y situación– son más invasivas cuanto mayor sea la deficiencia de los gametos, a fin de forzarlos a fecundarse mutuamente.

La calidad de los óvulos es dependiente de la edad materna, como ponen de manifiesto los estudios comparativos entre mujeres de la misma edad que conciben por vía natural, o con la ayuda de las TRA. Un factor a tener en cuenta es el índice de infertilidad, que se incrementa con la edad, y que la edad de la mayoría de mujeres que recurren a la FIV ha aumentado en los últimos años, lo que

hace más arriesgada la práctica de las TRA. Por otra parte una serie de tóxicos ambientales, irruptores endocrinos, han hecho disminuir la fertilidad masculina por causar mutaciones en el ADN, o en las zonas del mismo que regulan la expresión de unos genes concretos, conocidas como *mutaciones epigenéticas*.

Las técnicas restan el ambiente natural al embrión *in vitro*: el «diálogo molecular» que se establece desde el inicio de la fecundación entre los gametos, que le dan origen, y posteriormente el diálogo molecular del embrión con la madre, mientras éste atraviesa las trompas y preparan entre ambos la anidación en el útero materno, induciendo la tolerancia inmunológica de la madre al feto. El desarrollo de las condiciones de cultivo de los embriones en el laboratorio, y en su caso la congelación, por mucho que se haya perfeccionado con la experiencia a posteriori, no sustituye el entorno natural preciso, y el único que evita la vulnerabilidad del embrión precoz.

Se planteó la hipótesis razonable de que los tratamientos de infertilidad cuanto más invasivos fueran más problemas de salud causarían, tanto en las madres como en los hijos.

a) La estimulación ovárica es un proceso habitual, puesto que se precisa disponer de un mayor número de óvulos que los que maduran en un ciclo menstrual. Tanto si los óvulos son normales, como si tienen algún fallo –por ejemplo, por envejecimiento–, se recogen inmaduros y en número superior al normal, y son forzados a madurar en cultivo *in vitro* antes de ser fecundados. La maduración

4 Thompson, J.R., Williams, C.J. «Genomic imprinting and assisted reproductive technology: connections and potential risks». *Seminars in Reproductive Medicine* 23, 2005, 285–295.

in vitro de los óvulos fuera del ovario, que es su nicho, es un factor negativo⁵ por cambio en el estado del ADN siguiendo las instrucciones del medio.

b) La inseminación intrauterina conlleva tantos riesgos para la descendencia como las FIV/ICSI⁶. Requiere la estimulación ovárica de la mujer y tiene indicación cuando la infertilidad no está explicada, o cuando es por diversas causas posibles de la infertilidad masculina. Ambos gametos pueden estar comprometidos; de hecho, los resultados en términos de embarazo o de nacimiento, son mejores cuando se usa el semen de un donante externo que cuando se usa el de la pareja. La inseminación no es un sustitutivo de la FIV⁷.

El nivel de prevalencia de anomalías congénitas de Europa⁸, muestra que el riesgo potencial asociado a la insemina-

ción no debe ser ignorado y esta información debe ser comunicada no sólo a los responsables de llevarla a cabo, sino a las parejas que desean tratarse.

c) La ICSI es más perjudicial que la FIV convencional⁹. La fecundación forzada de un óvulo (FIV), más aún si es por inyección directa de un solo espermio al citoplasma (ICSI), ha mostrado un elevado riesgo para la descendencia, ya que la incapacidad fecundante de los espermios se debe generalmente a causas genéticas, bien asociadas a alteraciones del cromosoma Y, o bien a mutaciones inducidas por los tóxicos ambientales. Este riesgo que se traslada a las siguientes generaciones.

d) La tendencia de los últimos años ha sido de un aumento del uso de la ICSI y de la transferencia de embriones congelados y descongelados¹⁰. Con independencia del estado del óvulo, en la ICSI –especialmente indicada cuando la esterilidad de la pareja es por factor mascu-

5 Buckett, W.M, Chian, R.C., Holzer, H, Dean, N, Usher, R, Tan, S.L. «Obstetric outcomes and congenital abnormalities after in vitro maturation, in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection». *Obstetrics and Gynecology* 110, 2007, 885–891.

6 Sagot, P., Bechoua, S., Ferdynus, C., Facy, A., Flamm, X., Gouyon, J.B., Jimenez, C. «Similarly increased congenital anomaly rates after intrauterine insemination and IVF technologies: a retrospective cohort study». *Human Reproduction* 27, 2012, 902–909. Huang, C.T., Au, H.K., Chien, L.W., Chang, C.W., Chien, Y.Y., Tzeng, R. «Twin pregnancy outcome among cases of spontaneous conception, intrauterine insemination, and in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility* 86, 2006, 1017–1019.

7 ESHRE Capri Workshop Group. «Intrauterine Insemination» *Human Reproduction Update* 1, 2009, 1–13.

8 Dolk, H., Loane, M., Garne, E. «The prevalence of congenital anomalies in Europe». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 686, 2010, 349–364.

9 Cfr. entre otros: Hansen, M., Kurinczuk, J.J., Bower, C., Webb, S. «The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization». *New England Journal of Medicine* 346, 2002, 725–730. Bonduelle, M., Liebaers, I., Deketelaere, V., Derde, M.P., 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)». *Human Reproduction* 17(3), 2002, 671–694. Lie, R.T., Lyngstadaas, A., Orstavik, K.H., Bakketeig, L.S., Jacobsen, G., Tanbo, T. «Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods. a meta-analysis». *International Journal of Epidemiology* 34, 2005, 696–701.

10 Källén, B., Finnstrom, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.G. Olausson, P.O «Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years». *Human Reproduction* 25, 2010, 1026–1034.

lino— se incrementan las malformaciones congénitas de los nacidos. La congelación del embrión actúa como una selección embrionaria, tanto porque sólo los mejor dotados sobreviven a la descongelación, como porque el útero se recupera, con el tiempo, de las alteraciones debidas a la estimulación ovárica y facilita la anidación del embrión transferido.

Por otra parte, es bien conocido que la proporción de los nacidos vivos no ha aumentado, en los más de 30 años a pesar de que la tecnología se ha ido perfeccionando, viendo los resultados que se obtienen año tras año en términos de embarazo logrado, o de niño nacido. Sólo sobreviven aproximadamente un 15% a 30% de los embriones generados con estas técnicas¹¹.

e) Carecemos de datos fiables acerca de los riesgos añadidos al futuro de los nacidos generados *in vitro* por ICSI y sometidos a biopsia para el diagnóstico genético previo a la implantación¹². La situación actual, tanto en lo que se refiere a los errores del análisis, como a las muertes perinatales, debe mirarse desde la perspectiva de que este diagnóstico no tiene ninguna función terapéutica para los embriones analizados, sino que se trata de un sistema de selección que elige

los embriones que se transfieren en virtud de sus características.

f) Algunos de los problemas de salud de los nacidos por las TRA se asocian con el hecho, demostrado de manera consistente, de nacimientos múltiples, bajo peso al nacer y prematuridad. Estas situaciones conllevan con frecuencia déficit de salud a largo plazo.

En diversas ocasiones, se han ofrecido pediatras y obstetras para colaborar con los centros de Reproducción Asistida y ampliar los análisis del desarrollo neurológico de los niños, crecimiento, maduración en la pubertad, fertilidad, etc., a largo plazo. Algunas enfermedades aparecen más tarde y no pueden ser detectadas hasta que los nacidos alcanzan una cierta edad. Tratan también de poder diferenciar el riesgo para la salud, según las técnicas empleadas y el diagnóstico de esterilidad de los progenitores. No obstante las reiteradas alarmas por parte de pediatras y neonatólogos, las preguntas clave siguen sin hacerse, o más bien rehuyéndose:

¿Puede la exposición a un medio ambiente *in vitro*, diferente del natural, de los gametos y/o del embrión, alterar el desarrollo de órganos y tejidos?

¿Estamos en la superficie de un iceberg y podrán verse afectadas las siguientes generaciones?

El diagnóstico de las causas de esterilidad es esencial y, sin embargo, se ha investigado poco y no se conoce en muchos casos. Es imprescindible avanzar en esa investigación para poder definir una indicación clara para usar los diferentes procedimientos de las TRA, a fin

11 Gnoth, C., Maxrath, B., Skonieczny, T., Friol, K., Godehardt, E., Tigges, J. «Final ART success rates: a 10 years survey». *Human Reproduction* 26, 2011, 2239–224.

12 Liebaers, I., Desmyttere, S., Verpoest W., De Rycke, M., Staessen, M.C., Sermon K., Devroey, P., Haentjens, P. Bonduelle, M. «Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis». *Human Reproduction* 25, 2010, 275–282.

de minimizar los riesgos asociados a su carácter invasivo¹³.

Hay que tener en cuenta que la aplicación de estas técnicas tiene riesgos, y que éste no es un proceso dirigido a curar la esterilidad. Existe, por tanto, de entrada una objeción de ciencia a la aplicación de una tecnología sin garantías y, posiblemente en algunos casos, innecesaria o ineficaz.

Conocemos con seguridad que el riesgo es real. El trabajo publicado en el *The New England Journal of Medicine* con el estudio de más de 300.000 niños, de los que 6.163 habían sido generados por TRA, pone de manifiesto que el riesgo de nacer con algún tipo de defecto es mayor (8,3%) con cualquiera de las técnicas de TRA que cuando son engendrados (5,8%). Que existen diferencias significativas según la TRA empleada; con la FIV fue del 7,2%, mientras alcanza un 9,9% con la ICSI¹⁴.

También en 2012 queda claramente establecido que los nacidos únicos tras el empleo de la FIV/ICSI tienen más altos riesgos de sufrir complicaciones perinatales en comparación de los engendrados espontáneamente. Y se plantea la urgencia de determinar que aspecto de las técnicas causan más ries-

go y cómo podrían ser minimizados¹⁵.

La aplicación de las TRA generan síndromes raros, y aparecen casos recientes que muestran alteraciones no cuantificadas aún¹⁶.

Conocemos que hay alteraciones que aparecen a largo plazo, como la enfermedad sistémica pulmonar y cardiovascular, causadas por la exposición del embrión en los primeros días –en los que es especialmente vulnerable–, a un entorno adverso y a la estimulación ovárica¹⁷.

Todo ello nos habla de que, aún después de más de 30 años de investigación retrospectiva, las TRA no se controlan suficientemente.

Los motivos son muy claros: como no se cura la esterilidad, el hijo podrá padecer las consecuencias de las deficiencias de los gametos de sus padres. Pero aún en los casos en que los gametos no sean defectuosos, como ocurre con los provenientes de donantes, la aplicación de las técnicas causa excesivas deficiencias.

Obviamente, no ignoramos ni restamos importancia al problema de la gran cantidad de embriones que mueren en

13 Karpman, E., Williams, D.H., Lipshultz, L.I. «IVF and ICSI in male infertility: update on outcomes, risks, and costs». *The Scientific World Journal* 5, 2005, 922-932. Mandavilli, A. «As IVF becomes more common, some concerns remain». *Nature Medicine* 14, 2008, 1171.

14 Davies, M.J., Moore, V.M., Willson, K.J., Van Essen, P., Priest, K., Scott, H., Mgmt, B., Haan, E.A., Chan, A. «Reproductive Technologies and the Risk of Birth Defects». *New England Journal of Medicine* 366 (19), 2012, 1803-1813.

15 Pandey, S., Shetty, A., Hamilton, M., Bhattacharya, S., Maheshwari, A. «Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis». *Human Reproduction Update*, 18,2012, 485–503.

16 Fortunato, A., Tosti, E. «The impact of in vitro fertilization on health of the children: an update». *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 154, 2011, 125–131.

17 Scherrer, U., Rimoldi, S.F., Rexhaj, E., Stuber, T., Duplain, H., Garcin, S., de Marchi, S.F., Nicod, P., Germond, M., Allemann, Y., Sartori, C. «Systemic and Pulmonary Vascular Dysfunction in Children Conceived by Assisted Reproductive Technologies». *Circulation* 125, 2012, 1890-1896.

cada ciclo de FIV, ni de la certeza de que el hecho de que un embrión esté *in vitro* y no en el seno materno no cambia la naturaleza intrínseca de todo embrión humano. *In vitro* o *in vivo* son humanos. Tampoco ignoramos la indescriptible alegría que han supuesto millones de niños nacidos en el mundo, durante más de 30 años, de padres con problemas de esterilidad.

Desde hace años, la mayor parte de las publicaciones científicas sobre los riesgos para los hijos insisten en la obligación de informar a los que acuden en busca de asistencia a su infertilidad, de forma rigurosa y completa, del diagnóstico, posibilidades y de los riesgos concretos.

Si como se comienza a pensar, y preocupa, podemos estar sólo en la super-

ficie de un gran iceberg urge un debate público racional que revise la amplia permisividad de la legislación y, que tal vez ponga de manifiesto la conveniencia de establecer controles adecuados a los centros de TRA sobre el uso de las técnicas.

Describimos aquí uno de los más graves problemas que lleva consigo la aplicación de las TRA: el riesgo mayor de padecer enfermedades y malformaciones de los niños generados por las TRA respecto a los engendrados, que hoy es innegable. Datos que deben estar disponibles a quienes acuden a ellas, disponibles a la sociedad, y necesariamente han de ser tenidos en cuenta en las Comisiones Nacionales tanto de Bioética como de control de las TRA.

RIESGOS PARA LA SALUD DE LOS NACIDOS POR LAS TÉCNICAS DE FECUNDACIÓN ASISTIDA. LA PUNTA DE UN ICEBERG

HEALTH RISKS OF BIRTH BY ASSISTED FERTILIZATION TECHNIQUES. TIP OF THE ICEBERG

Natalia López Moratalla

*Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular.
Presidenta de AEBl. E-mail: natalialm@unav.es*

Alejandra Huerta Zepeda

*Dra. Biología Molecular.
Universidad P. de Puebla. México.*

Dolores Bueno López

*Master en Química Sostenible.
Universidad Pública de Navarra.*

Resumen

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) –Estimulación ovárica, Inseminación Intrauterina (IUI), o Fecundación *in vitro* (FIV)/Inyección Intra-Citoplasmática de un Espermio (ICSI)– han hecho posible el nacimiento de cientos de miles niños, muchos de los cuales están entrando en la edad adulta. Al inicio de los años 90 comienza una alerta pediátrica por los defectos y anomalías que presentaban estos niños, en proporción más alta que los nacidos de forma natural. Su peor salud se hace incuestionable a partir del 2002. Las técnicas son en sí sumamente agresivas; las pérdidas de embriones antes de la implantación, los abortos espontáneos y la mortalidad perinatal es muy elevada. No se ha hecho la imprescindible experimentación previa con animales: y las pruebas con animales fértiles han mostrado que las crías generadas *in vitro* presentan alteraciones graves. Sin embargo, los daños se atribuían, casi exclusivamente y de forma gratuita, a la edad avanzada de las mujeres usuarias de las técnicas, y a la esterilidad por las alteraciones genéticas de los espermatozoides, en aumento por

los contaminantes del ambiente. Se ha llevado a cabo una extensa experimentación humana directa, sin cumplir los requisitos mínimos de la experimentación humana, e ignorando qué papel desempeñan las técnicas en sí mismas y cómo se causan los defectos que padecen una parte de los así generados, ni exactamente que podrán transmitir a las siguientes generaciones. No estamos ante una cuestión de riesgo/beneficio sino ante un problema de salud. Las TRA no son intervenciones encaminadas a solucionar un problema físico o fisiológico vital. La proporcionalidad entre la satisfacción del deseo de maternidad/paternidad y los riesgos para la salud del hijo debe ser un criterio primario, aunque no el único.

Palabras clave: técnicas de reproducción asistida, salud de los nacidos, problema intergeneracional, genoma y epigenoma, epimutaciones.

Summary

Assisted Reproduction Techniques (ART) –Ovarian stimulation, intrauterine insemination (IUI) or In Vitro Fertilization (IVF) / Intracytoplasmic injection of sperm (ISCI)– have made possible the birth of hundreds of children, and many of them are entering adulthood. In the early 90's began a pediatric alert for defects and anomalies presented by these children, a higher proportion than those born naturally. Their health is unquestionably worse since 2002. Techniques used are extremely aggressive; the loss of embryos before implantation, spontaneous abortions and perinatal mortality is very high. Essential animal experimentation have not been carried out: and tests with fertile animals have shown that the offspring generated in vitro presented serious alterations. However, damages observed were simply ascribed almost entirely to the advanced age of women using these techniques, and sterility to genetic alterations of the sperm, increasing by environmental contamination. Extensive direct human experimentation has been carried out, but without observing the minimum requirements of human experimentation; ignoring the role of the techniques themselves, and how they cause defects in a number of children thus generated, or what they might transmit to future generations. This is not a question of risk / benefit regarding a health problem. The ART are not interventions to solve a physical or physiological vital problem. The proportionality between the satisfaction of the desire for maternity / paternity and risks to the child's health should be a primary criterion, although not the only one.

Key words: assisted reproduction techniques, health of newborns, intergenerational problem, genome and epigenome, epimutations.

1. Introducción

La biología de la transmisión de la vida ha avanzado de modo espectacular en las últimas décadas: las alteraciones hereditarias no se deben solamente a defectos de los *genes mutados* en el material genético heredado. La formación y maduración de los óvulos o de los espermatozoides, la misma fecundación, los primeros pasos de la vida embrionaria y en definitiva toda la vida de cada individuo, modifica el estado del material genético de manera dependiente del medio. La regulación de qué información genética se expresa y cuál se silencia en cada momento depende del estado del genoma en el tiempo, y en el espacio corporal.

La sustitución, imprescindible cuando se usan las TRA, del medio natural por el medio *in vitro* puede causar mutaciones en este nivel de regulación – *epimutaciones*– que se suman a las posibles alteraciones, que de suyo o por la manipulación técnica, puedan tener los gametos de los progenitores.

Una concatenación de causas lleva consigo el hecho de que la salud de los que llegan a nacer mediante el uso de las TRA será peor que la de los nacidos que fueron engendrados. Más aún, algunas de las epimutaciones del ADN pueden pasar a las siguientes generaciones.

El conocimiento de que la expresión de los genes está regulada de modo epigenético, es decir con el proceso mismo de desarrollo, y de forma dependiente de las condiciones del medio, no debería haber sido ignorado. Para muchos ha

sido, afortunadamente, una preocupación especial¹⁸, aunque sistemáticamente desoída por los Centros en que se llevan a cabo las TRA, y una llamada al rigor en la investigación.

Comenzamos por una breve descripción de la estrecha relación genes-ambiente en la transmisión de la vida y durante los primeros pasos de la vida naciente.

2. Genes y medio: mutaciones epigenéticas como una de las causas de alteraciones de salud de los generados por las TRA

2.1. Epigenoma y mutaciones epigenéticas

Desde los años 60 se empieza a vislumbrar que el ADN no es el único depósito de información. Por el contrario, existen dos niveles de información en los cromosomas heredados: la secuencia de bases del ADN, el *genoma*, y un segundo depósito que es conocido como *epigenoma*, que lleva a cabo la expresión regulada de los genes.

El término «epigenético» se introdujo por primera vez en 1940 por Conrad Waddington¹⁹ para describir las modifi-

18 Niemitz, E.L., Feinberg, A.P. «Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation». *American Journal of Human Genetics* 74, 2004, 599-609.

19 Waddington, C.H. «Epigenotype». *Endeavour* 1, 1942, 18-20. Jaenisch, R., Bird, A. «Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals». *Nature Genetics* 33, 2003, 245-54. Bollati, V., Bacca-relli, A. «Environmental epigenetics». *Heredity* 105, 2010, 105-212. Bernstein, B.E., Meissner, A., Lander, E.S. «The Mammalian Epigenome». *Cell* 128, 2007, 669-681.

caciones del ADN que permiten regular la expresión de los genes sin alterar la secuencia de bases y en función de los componentes de su medio interior o exterior. Así como el genoma –la secuencia de bases del ADN– no cambia en ninguna de las células de un organismo, ni a lo largo de la vida, el epigenoma –que reside en cambios químicos y estructurales del ADN– está en continuo cambio a lo largo de la vida, al compás de la interacción con el medio cambiante. Determina el estado de desarrollo del organismo y de las diversas células que constituyen los órganos, tejidos y sistemas de ese organismo. Los cambios mejor conocidos son la metilación del ADN, la modificación de las proteínas histonas y la expresión de RNA de pequeño tamaño. Aunque en este trabajo nos referiremos fundamentalmente a los cambios en la metilación, es importante señalar que la aparición y desaparición de los RNA de pequeño tamaño tiene un papel esencial como regulador de los grandes cambios epigenéticos en los procesos de transmisión de la vida y comienzo del desarrollo²⁰.

Estos cambios dejan accesible o bloquean la secuencia del ADN que señala el inicio de un gen²¹, por lo que se expresa o se silencia. Sin esta información, que se va creando paso a paso, y controlan-

do la expresión de los genes, no habría desarrollo embrionario, maduración, ni envejecimiento natural.

Se denominan *mutaciones epigenéticas*, a diferencia de las mutaciones genéticas, a alteraciones en las marcas en el ADN –patrón de metilación y unión de RNA–, que inciden en la regulación de la expresión de los genes. Esta regulación dependiente del medio tiene lugar fundamentalmente durante la formación de los gametos, la fecundación y las primeras etapas del desarrollo embrionario. De ahí que el cambio de las condiciones del medio genere alteraciones en el desarrollo embrionario y estas alteraciones pueden ser transmitidas a la siguiente generación. Las mutaciones epigenéticas están en la base de muchas enfermedades²², especialmente en los procesos de la reproducción²³.

2.2. Influencia del medio en los procesos de la transmisión de la vida

El patrón característico de los espermatozoides y de los óvulos, que se conoce como *impronta parental*, lógicamente se hereda como estado específico del material genético de los gametos desde los que se constituye en la fecundación el nuevo individuo. El epigenoma del óvulo y del espermatozoide ha de cambiar rápidamente durante el proceso de fecundación de modo que el epigenoma del cigoto esté

20 Bour'his, D., Voinnet, O. «A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development». *Science* 330, 2010, 617-622.

21 Chuang, J.C., Jones, P.A. «Epigenetics and MicroRNAs». *Pediatric Research* 61, 2007, 4R-9R. Kim, J., Samaranayake, M., Pradhan, S. «Epigenetic mechanisms in mammals». *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 2009, 596-612.

22 Petronis A. «Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases». *Nature* 465, 2010, 721-727.

23 Paoloni-Giacobino, A. «Epigenetics in Reproductive Medicine». *Pediatric Research* 61, 2007, 51R-57R.

en situación de empezar a desarrollarse. Esto es, cada cigoto comienza a desarrollarse, *in vivo* o *in vitro*, con un genoma y un epigenoma recién estrenado, renovado con la fecundación²⁴.

Esto exige que la impronta de los cromosomas paternos y maternos sufra una *reprogramación epigenética* durante el tiempo que dura el proceso de la fecundación.

Y una vez constituido el cigoto y en los 5 o 6 días de desarrollo embrionario, antes de iniciar la anidación, se borran la mayoría de las marcas, a ritmo y con patrón diferente, de la herencia genética paterna y materna. Al mismo tiempo se establecen otras nuevas que van así creando el epigenoma del nuevo individuo, con una impronta específica de cada órgano y tejido²⁵, se permite así, la expresión de los genes necesarios para el desarrollo completo.

Solamente en una serie de genes, denominados *genes con impronta*, no cambian las marcas reguladoras durante esta ola de cambios que tiene lugar en la

fecundación. De modo que cada copia guarda la impronta parental paterna o materna, que regula específicamente la expresión de estos genes: una copia se expresa y la otra se silencia. Estos genes con impronta²⁶ desempeñan un papel regulador fundamental en los primeros pasos del desarrollo embrionario.

2.3. El estado de los gametos: epimutaciones

La génesis y maduración de los gametos es un proceso de una enorme precisión que requiere como nicho natural el cuerpo masculino o el femenino. De su estado depende una diferenciación estable durante el desarrollo embrionario, tras su mutua fecundación²⁷.

El epigenoma del espermio se establece pronto, al comienzo del proceso de génesis y maduración de los espermios, antes de que pueda ser alterado por los procesos de las TRA²⁸. Por ello la mayor parte de las causas de esterilidad masculina se deben a defectos ya existentes en el genoma, o en el epigenoma de los espermios y, que por tanto, se transmi-

24 Dolinoy, D.C., Weidman, J.R., Waterland, R.A., Jirtle, R.L. «Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome». *Environmental Health Perspectives* 14, 2006, 567-572. Li, E. «Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development». *Nature Reviews. Genetics* 3, 2002, 662-673. Reik, W., Dean, W., Walter, J. «Epigenetic reprogramming in mammalian development». *Science* 293, 2001, 1089-1093.

25 Li, E. «Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development». *Nature Reviews. Genetics* 3, 2002, 662-673. Reik, W., Dean, W., Walter, J. «Epigenetic reprogramming in mammalian development». *Science* 293, 2001, 1089-1093. Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., Reik, W. «Epigenetic reprogramming in mammals». *Human Molecular Genetics* 14, 2005, R47-58.

26 Weaver, J.R., Susiarjo, M., Bartolomei, M.S. «Imprinting and epigenetic changes in the early embryo». *Mammalian Genome* 20, 2009, 532-543.

27 Bonasio R., Tu S., Reinberg D. «Molecular signals of epigenetic states». *Science* 330, 2010, 612-616. Schaefer, Ch.B., Ooi, S. K. T., Bestor, T.H., Bourchis, D. «Epigenetic Decisions in Mammalian Germ Cell» *Science* 316, 2007, 398-399.

28 Marques, C.J., Carvalho, F., Sousa, M., Barros, A. «Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis» *Lancet* 363, 2004, 1700-1702. Marques, C.J., Francisco, T., Sousa, S., Carvalho, F., Barros, A., Sousa, M. «Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 585-594.

ten a la descendencia. Sin embargo, es alarmante que diversos tóxicos ambientales causan alteraciones del ADN de los espermatozoides²⁹, y epimutaciones en genes específicos que están implicados en la espermatogénesis. La disminución de la espermatogénesis humana se asocia con defectos de la impronta de algunos genes³⁰. La alteración del ADN tiene efectos muy negativos para el embrión generado por las TRA³¹, por lo que no es de extrañar que se plantee analizar el ADN de los espermios como garantía³².

Se conoce poco acerca del cambio de la impronta en la maduración natural, o *in vitro*, de los óvulos pero hay numerosos

datos acerca de que la estimulación ovárica, proceso común a todas las TRA, afecta a la impronta³³. La manipulación de los óvulos requiere la estimulación ovárica, la recogida de oocitos inmaduros y su maduración en cultivo *in vitro*. Si sufren epimutaciones y llegan a ser fecundados tienen efectos negativos en el embrión. En animales, la estimulación ovárica retarda el desarrollo embrionario, aumenta la formación anormal del blastocisto, retarda el crecimiento y aumenta la pérdida fetal³⁴. Los oocitos humanos inmaduros, si no logran una correcta reprogramación *in vitro*, conducen si son forzados a sufrir fecundación, a enfermedades e incluso a la muerte del embrión³⁵.

Una epimutación de los gametos que afecte a los genes con impronta, esenciales para el normal desarrollo del embrión temprano, lleva a desordenes

29 Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., Delbes, G., Hales, B.F., Robaire, B. «Toxicants and human sperm chromatin integrity». *Molecular Human Reproduction* 16, 2010, 14–22.

30 Filippini, D., Feil, R. «Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia». *Epigenetics* 4, 2009, 27–30. Houshdaran, S., Cortessis, V.K., Siegmund, K., Yang, A., Laird, P.W., Sokol, R.Z. «Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm». *PLoS One* 2, 2007, e1289. Trasler, J.M. «Epigenetics in spermatogenesis». *Molecular Cell Endocrinology* 306, 2009, 33–36.

31 Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M.A., Fava, L., Flamigni, C., Coticchio, G. «Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART». *Human Reproduction* 21, 2006, 2876–2881. Zini, A., Boman, J., Belzile, E., Ciampi, A. «Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis». *Human Reproduction* 23, 2008, 2663–2668.

32 Barratt, C.L.R., Aitken, R.J., Bjorndahl, L., Carrell, D.T., de Boer, P., Kvist, U., Lewis, S.E.M., Perreault, S.D., Perry M.J., Ramos, L., Robaire, B., Ward, S., Zini, A. «Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—a position report». *Human Reproduction* 25, 2010, 824–838.

33 Borghol, N., Lornage, J., Blachere, T.S., Garret, A., Lefevre, A. «Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation». *Genomics* 87, 2006, 417–426. Geuns, E., Hilven, P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., De Rycke, M. «Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes». *Journal of Medical Genetics* 44, 2007, 144–147. Sato, A., Otsu, E., Negishi, H., Utsunomiya, T., Arima, T. «Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes». *Human Reproduction* 22, 2007, 26–35.

34 Van der Auwera, I., D’Hooghe, T. «Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development». *Human Reproduction* 16 (6), 2001, 1237–1243. Stouder, C., Deutsch, S., Paoloni-Giacobino, A. «Superovulation in mice alters the methylation pattern of imprinted genes in the sperm of the offspring». *Reproductive Toxicology* 28, 2009, 536–541.

35 Obata, Y., Hiura, H. «Epigenetically immature oocytes lead to loss of imprinting during embryogenesis» *Journal of Reproduction and Development* 57, 2011, 327–334.

del crecimiento de la placenta, causa un crecimiento intrauterino reducido y se relaciona con varios síndromes y riesgo de algunos tipos de cáncer, como analizamos más adelante.

2.4. Fecundación

El requerimiento de estimulación ovárica, con sus posibles alteraciones de la impronta parental, y las alteraciones que de por sí tengan los espermatozoides potencian una combinación del genotipo parental deficiente para el complejo desarrollo inicial del embrión generado artificialmente. Durante el proceso de fecundación, la impronta del genoma paterno cambia rápidamente, fundamentalmente por pérdida de grupos metilos de citosinas del ADN³⁶. El medio en que se realiza la fecundación es importante, como en todo proceso epigenético.

2.5. Epimutaciones por el cultivo del embrión

En varios experimentos con animales se ha puesto de manifiesto que el cultivo del embrión *in vitro* causa mutaciones epigenéticas y altera los genes con impronta³⁷ relacionados con el crecimiento, de forma dependiente de las condiciones del medio que se emplee³⁸. En medios

en pobres condiciones, los embriones de ratón, procedentes de una estimulación ovárica, presentan fallos del desarrollo y del sistema neuromotor, tienen más patologías y algunos órganos fueron de mayor tamaño que en los controles.³⁹ Estos efectos se habían observado también en oveja⁴⁰.

Generalmente el medio de cultivo contiene suero fetal bovino, que provee un ambiente rico para el desarrollo del embrión. Sin embargo, contiene compuestos activos, como hormonas, factores de crecimiento, que paradójicamente reducen

of *in vitro* fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos». *Reproduction* 134, 2007, 63–72. Fauque, P., Jouannet, P., Lesaffre, C., Ripoche, M.A., Dandolo, L., Vaiman, D., *et al.* «Assisted reproductive technology affects development kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos». *BMC Developmental Biology* 18, 2007, 116. Rivera, R.M., Stein, P., Weaver, J.R., Mager, J., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S. «Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development». *Human and Molecular Genetics* 17, 2008, 1–14. Rinaudo, P.F., Giritharan, G., Talbi, S., Dobson, A.T., Schultz, R.M. «Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos». *Fertility and Sterility* 86, 2006, 1252–1265.

39 Fernandez-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jimenez, A., Perez-Crespo, M., Ramirez, M. A., Rodríguez De Fonseca, F., Pintado, B., Gutiérrez-Adán, A. «Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2004, 5880–5885.

40 Gardner, D.K., Lane, M., Spitzer, A., Batt, P.A. «Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development». *Biology of Reproduction* 50, 1994, 390–400.

36 Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T. «Demethylation of the zygotic paternal genome» *Nature* 403, 2000, 501–502.

37 Rinaudo, P.F., Giritharan, G., Talbi, S., Dobson, A.T., Schultz, R.M. «Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos». *Fertility and Sterility* 86, 2006, 1252–1265.

38 Giritharan, G., Talbi, S., Donjacour, A., Di Sebastiano, F., Dobson, A.T., Rinaudo, P.F. «Effect

el potencial del desarrollo temprano del embrión, causan anormalidades metabólicas y anormalidades en las estructuras embrionarias. Estas señales erróneas provocan una desregulación de los genes por modificaciones epigenéticas del genoma⁴¹.

La programación del desarrollo, crecimiento y fisiología se afectan irreversiblemente durante el periodo previo a la implantación por un inadecuado cultivo *in vitro*. Se ha sugerido la posibilidad de que la metionina contenida en medios de cultivo comerciales para las TRA pueda estar críticamente involucrada en inducir mutaciones epigenéticas y se ha expresado preocupación porque los contenidos químicos de tales medios no están siempre claramente documentados por los fabricantes⁴².

Un posible mecanismo de las epimutaciones es que el cultivo de los embriones dé lugar a una elevada producción de especies reactivas de oxígeno por parte de las mitocondrias. Esas moléculas alteran el ADN, el patrón normal epigenético y la posterior expresión génica en el embrión⁴³. De hecho se ha descrito una

expresión alterada de genes después de la fecundación *in vitro*, específicamente en la placenta⁴⁴; justamente genes que están involucrados en el metabolismo energético, en la reparación del ADN y en la respuesta al estrés. La producción insuficiente de energía en la placenta, y genes en el metabolismo de la disfunción ponen de relieve la vulnerabilidad de la placenta en relación a su entorno.

2.6. La congelación/descongelación de los embriones y su posterior transferencia

Se conoce que tras ser descongelados algunos embriones presentan una pérdida de la capacidad de desarrollo. En las publicaciones de 2009 y 2011, que resumen los resultados de los centros europeos de TRA, se describe que el número de embriones, a nivel internacional, oscila alrededor de 430.000 por año. Más de la mitad –unos 240.000– se generaron por ICSI. El número de embriones congelados –tras pasar un examen basado en las características morfológicas básicas, generalmente en la fase de blastocisto, de unos 5 o 6 días–, y descongelados es de 108.000. El 5%, incluso el 10%, de esos embriones no podrán ser transferidos por alteraciones en el desarrollo. Sólo el 19,37% de todos los embriones descongelados logró implantarse y de ellos el 47,40% continuaron la gestación y nacie-

tabolism and development». *Trends in Endocrinology and Metabolism* 22 (10), 2011, 412-420.

44 Zhang, Y., Zhang, Y.L., Feng, C., Wu, Y.T., Liu, A.X., Sheng, J.Z., et al. «Comparative proteomic analysis of human placenta derived from assisted reproductive technology». *Proteomics* 8, 2008, 4344-4346

41 Reik, W., Romer, I., Barton, S.C., Surani, M.A., Howlett, S.K. and Klose, J. «Adult phenotype in the mouse can be affected by epigenetic events in the early embryo». *Development*, 119, 1993, 933-942. Reik, W. «Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth». *Reviews of Reproduction* 1, 1996, 73-77. Reik, W., Walter, J. «Genomic imprinting: parental influence on the genome». *Nature Review Genetics* 2, 2001, 21-32

42 Niemitz, E.L., Feinberg, A.P. «Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation». *American Journal of Human Genetics* 74, 2004, 599-609.

43 Chason, R.J., Csokmay, J., Segars, J.H., Decherney, A.H., Armant, D.R. «Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo me-

ron vivos. El porcentaje de éxito de bebés nacidos no alcanza pues el 15%. Además algunos son prematuros y la mortalidad neonatal alcanza el 2,54%.

Algunas malformaciones, y parálisis cerebral son más frecuentes en embriones sometidos a las TRA con o sin congelación incluida que en los concebidos de forma natural. Algunos riesgos –prematuidad y bajo peso al nacer, secuelas neurológicas y otras enfermedades– son paradójicamente menos frecuentes en los nacidos de embriones congelados que en los nacidos de embriones transferidos sin congelación⁴⁵. Sin embargo parece lógico que sea así, ya que la congelación no permite que los embriones defectuosos puedan resistir la descongelación, se implanten en útero y lleguen a nacer. En efecto, el microambiente del útero tras unos días de que la mujer haya sufrido el proceso de estimulación ovárica es tóxico para la implantación del embrión. El mero distanciamiento en el tiempo por conservar el embrión en frío elimina el entorno adverso.

El filtro de selección de embriones mediante su crioconservación se realiza de forma especial en los fecundados por ICSI⁴⁶. Por una parte, llevan el efecto de

la inyección en sus membranas, además se fuerza enormemente la fecundación y puesto que la indicación de usar la ICSI es el factor masculino de esterilidad, los espermios pueden ser defectuosos.

3. Estudios sistemáticos comparativos de la salud según modo de ser concebidos

Hasta finales de los años ochenta no se comienza a realizar estudios sistemáticos sobre la salud de los niños nacidos por recurso a las TRA. En 1990⁴⁷ se publicaron los estudios del *Medical Research Council* que recogían los datos de la salud en el primer año de vida de los nacidos desde 1978 a 1987; cuando se compararon con los concebidos naturalmente, presentaban un aumento –relativamente bajo– de malformaciones congénitas graves.

A lo largo de la década de los 90 se observa una clara relación entre la aplicación de la FIV, y la prematuridad y bajo peso de los niños al nacer. Se describe hipertensión, enfermedades cardíacas, y osteoporosis y un mayor grado de malformaciones⁴⁸.

Nilsson, E., Nygren, K.G. Olausson, P.O «Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years» *Human Reproduction* 25, 2010, 1026–1034.

47 Beral, V., Doyle, P. «Births in Great Britain resulting from assisted conception 1978-1987. Report of the MRC Working Party on children conceived by in-vitro fertilization». *British Medical Journal* 300, 1990, 1229-123.

48 Entre otros: Bergh, T., Ericson A., Hillensjö, T., Nygren, K.G., Wennerholm, U.B. «Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study». *Lancet* 354, 1999, 1579-1585.

45 Pelkonen, S., Koivunen, R., Gissler, M., Nuojua-Huttunen, S., Suikkari, A.-M. Hyden-Granskog, C., Martikainen, H., Tiitinen, A., Hartikainen, A.-L. «Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995–2006». *Human Reproduction* 25, 2010, 914–923. Pinborg, A., Loft, A., Aaris Henningsen, A.-K, Rasmussen, S., Nyboe Andersen, A. «Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: The Danish National Cohort Study 1995–2006». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 1320–1327.

46 Källén, B., Finnstrom, O., Lindam, A.,

En el año 2002 salta la alarma en la comunidad científica con la publicación del artículo de Hansen⁴⁹, que muestra que los niños concebidos por FIV o por ICSI, tenían casi una doble prevalencia (8,8% frente a 4,2%) de alteraciones cromosómicas, malformaciones cardíacas, atresia esofágica y malformaciones craneales, durante el primer año de vida, que los niños engendrados naturalmente. La preocupación por el riesgo de daños en los nacidos con la utilización de las TRA no se oculta⁵⁰, empieza a ser elocuente y de hecho se ha confirmado con el paso del tiempo.

Varias revisiones y meta-análisis recogen numerosos datos, ponen de manifiesto los diversos tipos de riesgos y destacan las posibles causas, a lo largo de los años hasta 2005⁵¹.

49 Hansen, M. and cols, *op. cit.*9.

50 Winston, R.M., Hardy, K., «Are we ignoring potential dangers of in vitro fertilization and related treatments?» *Nature Cell Biology* 4, 2002, S14-S18 and *Nature Medicine* 8, 2002, S14-S18.

51 Entre otros: Hansen, M., and cols *op. cit.*1. Bonduelle, M., Liebaers, I., Deketelaere, V., Derde, M.P., 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)». *Human Reproduction* 17(3), 2002, 671-694. Bonduelle, M., Wennerholm, U.B., Loft, A., Tarlatzis, B.C., Peters, C., Henriët, S., Mau, C., Victorin-Cederquist, A., Van Steirteghem, A., Balaska, A., Emberson, J.R., Sutcliffe, A.G. «A multi-centre cohort study of the physical conception». *Human Reproduction* 20, 2005, 413-419. Schieve, L.A., Rasmussen, S.A., Buck, G.M., Schendel, D.E., Reynolds, M.A., Wright, V.C. «Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes?» *Obstetrics and Gynecology* 103, 2004, 1154-1163. Schieve, L.A., Rasmussen, S.A., Reefhuis, J. «Risk of birth defects among children conceived with assisted reproductive technology: providing an epidemiologic context to the data». *Fertility and*

Como es razonable esperar, los datos son dependientes del tipo de daño que se examina, del número de niños, de las variables, que se tienen o no en cuenta –como edad de la madre, causa de infertilidad, etc.–, tanto en los concebidos por las TRA, como en controles engendrados naturalmente. No sorprende por tanto que unos artículos no encuentren diferencias significativas entre los examinados y los controles.

En el anexo 1 se presenta un listado de las publicaciones científicas de los análisis realizados. De algunos de los artículos no se realizan comentarios en el texto. Pasamos a comentar los diversos tipos de riesgos y, en la medida que pueda deducirse de los datos publicados, cuál es la causa o causas.

3.1. Embarazos múltiples

Es evidente que las técnicas de TRA incrementan los embarazos múltiples⁵².

Sterility 84, 2005, 1320-1324. Rimm, A.A., Katayama, A.C., Diaz, M., Katayama, K.P. «A Meta-Analysis of Controlled Studies Comparing Major Malformation Rates in IVF and ICSI Infants with Naturally Conceived Children». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21, 2004, 437-443.

52 Reynolds, M.A., Schieve, L.A., Jeng, G., Peterson, H.B., Wilcox, L.S. «Risk of multiple birth associated with in vitro fertilization using donor eggs». *American Journal of Epidemiology* 154, 2001, 1043-1050. Vahratian, A., Schieve, L.A., Reynolds, M.A., Jeng, G. «Live-birth rates and multiple-birth risk of assisted reproductive technology pregnancies conceived using thawed embryos, USA, 1999-2000». *Human Reproduction* 18 (7), 2002, 1442-1448. Martin, J.A., Hamilton, B.E., Sutton, P.D., Ventura, S.J., Menacker, F., Kirmeyer, S., *et al.* «Births: final data for 2006». *National Vital Statistics Reports* 57, 2009, 1-101.

La reiterada recomendación internacional de evitar estos embarazos, reduciendo la estimulación ovárica y transfiriendo un solo embrión, se ha desoído durante tiempo. Los embarazos múltiples, llevan consigo mayores índices de morbi-mortalidad durante el período perinatal y discapacidad a largo plazo⁵³. En un estudio de seguimiento a lo largo de 20 años se confirma el efecto negativo⁵⁴.

53 Entre otros: Elster, N. «Less is more: the risks of multiple births». *Fertility and Sterility* 74, 2000, 617-623. Moise, J, Laor, A., Armon, Y., Gur, I., Gale, R. «The outcome of twin pregnancies after IVF». *Human Reproduction* 13(6), 1991, 702-1705. Sunderam, S., Chang, J., Flowers, L., Kulkarni, A., Sentelle, G., Jeng, G., Macaluso, M. «Assisted Reproductive Technology Surveillance--United States, 2006». *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries* 58(SS05), 2009, 1-25. McDonald, S., Murphy, K., Beyene, J., Ohlsson, A. «Perinatal outcomes of in vitro fertilization twins: a systematic review and meta-analyses». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193, 2005, 141-152. Yoon, G., Beischel, L.S., Johnson, J.P., Jones, M.C. «Dizygotic twin pregnancy conceived with assisted reproductive technology associated with chromosomal anomaly, imprinting disorder, and monochorionic placentation». *The Journal of Pediatrics* 146, 2005, 565-567. Li, S.J., Ford, N., Meister, K., Bodurtha, J. «Increased risk of birth defects among children from multiple births». *Birth Defects Research. Part A. Clinical and Molecular Teratology* 67, 2003, 879-885. Huang, C.T., Au, H.K., Chien, L.W., Chang, C.W., Chien, Y.Y., Tzeng, R. «Twin pregnancy outcome among cases of spontaneous conception, intrauterine insemination, and in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility* 86, 2006, 1017-1019.

54 Scotland, G.S., McLernon, D., Kurinczuck, J.J., McNamee, P., Harrild, K, Lyall, H., Rajkhowa, M., Hamilton, M., Bhattacharya, S. «Minimising twins in *in vitro* fertilisation: a modelling study assessing the costs, consequences and cost-utility of elective single versus double embryo transfer over a 20-year time horizon». *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 118(19), 2011, 1073-1083.

Además los gemelos de TRA requieren más ayuda médica que los concebidos naturalmente⁵⁵.

Los embarazos múltiples han disminuido considerablemente en los últimos años, por el hecho de que se transfieren menos embriones. Hasta 1992 el incremento de gemelos alcanzó aproximadamente un 30% de los nacimientos y fue declinando hacia un 5% en el año 2010 y es prácticamente nulo el nacimiento de más de dos⁵⁶. Es importante, al respecto, que la transferencia de un solo embrión fresco ha mostrado los mismos porcentajes de éxito que la transferencia simultánea de dos embriones⁵⁷. Esta es una cuestión dependiente de la calidad de los centros, como pone de manifiesto que las mujeres con mayor estatus socioeconómico, que pueden llevar un seguimiento riguroso y más atención

55 Doornbos, M.E., Maas, S.M., McDonnell, J., Vermeiden, J.P.W., Hennekam Hansen, M., Colvin, L., Petterson, B., Kurinczuk, J.J., de Klerk, N., Bower, C. «Twins born following assisted reproductive technology: perinatal outcome and admission to hospital» *Human Reproduction* 24, 2009, 2321-2331. Pinborg, A., Loft, A., Rasmussen, S., Nyboe Andersen, A. «Hospital care utilization of IVF/ICSI twins followed until 2-7 years of age: a controlled Danish national cohort study». *Human Reproduction* 19, 2004, 2529-2536; Bower, C. «Admission to hospital of singleton children born following assisted reproductive technology (ART)». *Human Reproduction* 23, 2008, 1297-1305.

56 Källén, B., Finnstrom, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.G. Olausson, P.O «Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years» *Human Reproduction* 25, 2010, 1026-1034.

57 Thurin, A., Hausken, J., Hillensjo, T., Jablonska, B., Pinborg, A., Strandell, A., et al. «Elective single embryo transfer versus double embryo transfer in in vitro fertilization». *New England Journal of Medicine*. 351, 2004, 2392-2402.

prenatal, tienen en general menos gemelos y mejores resultados perinatales⁵⁸.

No obstante, existen también riesgos para la salud de los nacidos únicos y, de hecho, las malformaciones congénitas no han disminuido⁵⁹. Y en 2012 salta un clara alarma en cuanto que los nacidos únicos con el recurso de la FIV/ICSI tienen un riesgo mayor de complicaciones perinatales que los concebidos espontáneamente⁶⁰.

3.2. Bajo peso en relación a la edad gestacional

Otro efecto negativo sobre la salud es el bajo peso al nacer, que ocurre con mayor frecuencia con el uso de la TRA que con los engendrados naturalmente⁶¹, tanto en los nacidos de embarazos

simples como de embarazos múltiples, y con las diversas TRA. El bajo peso genera hipotensión que afecta al desarrollo neurológico⁶².

3.3. Parálisis cerebral, epilepsia y ataques febriles

La parálisis cerebral es un trastorno permanente, y no progresivo, que afecta al desarrollo psicomotor, ocasionando limitaciones importantes en la actividad como consecuencia de complicaciones en el desarrollo cerebral del feto. Diversos estudios desde 2006 han afirmado que los niños nacidos tras FIV o ICSI tienen mayor riesgo de sufrirla⁶³; además presentan mayor prevalencia en el retraso mental

58 Boulet SL, Schieve LA, Nannini A, et al. «Perinatal outcomes of twin births conceived using assisted reproduction technology: a population-based study». *Human Reproduction* 23, 2008, 1941-1948.

59 Knoester, M., Vandenbroucke, J.P., Helmerhorst, F.M., van der Westerlaken, L.A., Walther, F.J., Veen, S. «Matched follow-up study of 5-8 year old ICSI-singletons: comparison of their neuromotor development to IVF and naturally conceived singletons». *Human Reproduction* 22, 2007, 1638-1646.

60 Cit en 15.

61 Schieve, L.A., Meikle, S.F., Ferre, C., Peterson, H.B., Jeng, G., Wilcox, L.S. «Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology». *New England Journal of Medicine* 346, 2002, 731-737. McDonald, S.D., Han, Z., Mulla, S., Murphy, K.E., Beyene, J., Ohlsson, A. «Preterm birth and low birth weight among in vitro fertilization singletons: a systematic review and meta-analysis». *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 148, 2010, 105-113. Helmerhorst, F.M., Perquin, D.A., Donker, D., Keirse, M.J. «Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies». *BMJ* 328, 2004, 261-264. Fujii, M., Matsuoka, R., Bergel, E.,

van der Poel, S., Okai, T. «Perinatal risk in singleton pregnancies after in vitro fertilization». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 2113-2117.

62 Pellicer, A., Bravo, M.C., Madero, R., Salas, S., Quero, J., Cabañas, F. «Early Systemic Hypotension and Vasopressor Support in Low Birth Weight Infants: Impact on Neurodevelopment». *Pediatrics* 123, 2009, 1369-1376.

63 Zhu, J. L., Basso, O., Obel, C., Bille, C., Olsen, J., Hvidtjorn, D. «Infertility, infertility treatment and psychomotor development: the Danish National Birth Cohort». *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 23, 2009, 98-106. Zhu J, Hvidtjrn D, Basso O, Obel C, Thorsen P, Uldall P, et al. «Parental infertility and cerebral palsy in children». *Human Reproduction* 25 (12), 2010, 3142-3145. Hvidtjorn, D., Grove, J., Schendel, D.E., Vaeth, M., Ernst, E., Nielsen, L., et al. «Cerebral palsy among children born after in vitro fertilization: the role of preterm delivery—a population-based, cohort study». *Pediatrics* 118, 2006, 475-482. Hvidtjorn, D., Grove, J., Schendel, D., Sværke, C., Schieve L.A., Uldall, P. Ernst E., Jacobsson B., Thorsen, P. «Multiplicity and early gestational age contribute to an increased risk of cerebral palsy from assisted conception: a population-based cohort study» *Human reproduction* 25, 2010, 2115-2123.

y la disfunción ocular severa asociados a esta enfermedad, así como trastornos del espectro del autismo⁶⁴.

Los hijos de parejas subfértiles, con tratamiento hormonal de un año, tienen mayor riesgo de epilepsia y ataques febriles que los que han tenido menos de 5 meses de tratamiento y que los que conciben espontáneamente⁶⁵.

3.4. Principales causas

Estos riesgos parecen relacionados principalmente por el tratamiento de activación ovárica y maduración de los oocitos, tanto en los procedentes de partos múltiples como también en el caso de los nacidos únicos⁶⁶; las epimutaciones de algunos genes con impronta afectan al crecimiento por acción sobre la placenta⁶⁷.

64 Hvidtjørn, D., Schieve, L., Schendel, D., Jacobsson, B., Svaerke, C., Thorsen, P. «Cerebral palsy, autism spectrum disorders, and developmental delay in children born after assisted conception: a systematic review and meta-analysis». *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 163, 2009, 72–83.

65 Sun, Y., Vestergaard, M., Christensen, J., Zhu, J.L., Bech, B.H., Olsen, J. «Epilepsy and febrile seizures in children of treated and untreated subfertile couples». *Human Reproduction* 22, 2007, 215–220.

66 Gaudoin, M., Dobbie, R., Finlayson, A., Chalmers, J., Cameron, I.T. «Ovulation induction/intrauterine insemination in infertile couples is associated with low-birth weight infants». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 188, 2003, 611–636. Klemetti, R., Sevón, T., Gissler, M., Hemminki, E. «Health of children born after ovulation induction». *Fertility and Sterility* 93, 2010, 1157–1168. D'Angelo, D.V., Whitehead, N., Helms, K.W., Barfield, Ahluwalia, I.B. «Birth outcomes of intended pregnancies among women who used assisted reproductive technology, ovulation stimulation, or no treatment». *Fertility and Sterility* 96, 2011, 314–320.

67 Guo, L., Choufani, S., Ferreira, J., Smith, A., Chitayat, D., Shuman, C., et al. «Altered gene expres-

Algunas epimutaciones de los genes con impronta, que requieren usar sólo la copia paterna en los espermios, podrían estar relacionadas también con el bajo peso al nacer de los niños concebidos por ICSI.

Los datos sobre los efectos de la estimulación ovárica pueden estar subestimados, ya que como es conocido hay nacimientos de madres que la utilizan sin acudir a los centros. Se estima⁶⁸ que 4,6% de los niños nacidos en Estados Unidos en 2005 fueron concebidos tras esta estimulación y este es un grupo importante que no ha tenido seguimiento.

4. Malformaciones, alteraciones cromosómicas y herencia de la esterilidad

Está confirmado el mayor riesgo de defectos de nacimiento, tanto en los hijos únicos como los que proceden de embarazos múltiples, concebidos mediante TRA en comparación con los concebidos sin tratamiento.

4.1. Malformaciones

Numerosos artículos refieren un incremento de malformaciones congénitas en niños generados *in vitro* respecto a los engendrados⁶⁹. El riesgo de padecerlas es

sion and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae». *Developmental Biology* 320, 2008, 79–91.

68 Schieve, L., Devine, O., Boyle, C.A., Petrini, J.R., Warner, L. «Estimation of the contribution of non-assisted reproductive technology ovulations stimulation fertility treatments to US singleton and multiple births». *American Journal of Epidemiology* 170(11), 2009, 1396–1407.

69 Entre otras: Rimm, A.A., Katayama, A.C., Diaz, M., Katayama, K.P. «A Meta-Analysis of

diferente según el tipo: el factor de riesgo es 9,85 para las gastrointestinales, 2,30 para las cardiovasculares y 1,54 para los defectos músculo esqueléticos⁷⁰.

Controlled Studies Comparing Major Malformation Rates in IVF and ICSI Infants with Naturally Conceived Children». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21, 2004, 437-443. Klemetti, R., et al. «Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies». *Fertility and Sterility* 84, 2005, 1300-1307. Merlob, P., Sapir, O., Sulkes, J., Fisch, B. «The prevalence of major congenital malformations during two periods of time, 1986-1994 and 1995-2002 in newborns conceived by assisted reproduction technology». *European Journal of Medical Genetics* 48, 2005, 5-11. Zhu, J.L., Basso, O., Obel, C., Bille, C., Olsen, J. «Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort». *BMJ* 333, 2006, 679; Alukal, J. P., Lipshultz, L.I. «Safety of assisted reproduction, assessed by risk of abnormalities in children born after use of *in vitro* fertilization techniques». *Nature Clinical Practice Urology* 5, 2008, 140-150. Buckett, W.M., Chian, R.C., Holzer, H., Dean, N., Usher, R., Tan, S.L. «Obstetric outcomes and congenital abnormalities after *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, and intracytoplasmic sperm injection». *Obstetrics and Gynecology* 110, 2007, 885-891. El-Chaar, D., Yang, Q., Gao, J., Bottomley, J., Leader, A., Wen, S.W., Walker, M. «Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction» *Fertility and Sterility* 92, 2009, 1557-1561. Wood, H.M., Babineau, D., Gearhart, J.P. «*In vitro* fertilization and the cloacal/bladder exstrophyepispadias complex: A continuing association». *Journal of Pediatric Urology* 3, 2007, 305-310. Delbaere, I., Goetgeluk, S., Derom, C., De Bacquer, D., De Sutter, P., Temmerman, M. «Umbilical cord anomalies are more frequent in twins after assisted reproduction» *Human Reproduction* 22, 2007, 2763-2767. Midrio, P., Nogare, C.D., Di Gianantonio, E., Clementi, M. «Are congenital anorectal malformations more frequent in newborns conceived with assisted reproductive techniques?» *Reproductive Toxicology* 22, 2006, 576-577.

⁷⁰ Reefhuis, J., Honein, M.A., Schieve, L.A., Rasmussen, S.A. «Use of clomiphene citrate and birth defects, National birth defects prevention study, 1997-2005». *Human Reproduction* 26, 2011, 451-457. Ericson, A., Källén, B. «Congenital malforma-

Se han descrito malformaciones del tracto genital masculino asociadas a la esterilidad masculina paterna y, que fueron generados por ICSI; el riesgo es mayor del 5% frente a menos de 1% de los engendrados⁷¹. Puede estar relacionado el riesgo de este tipo con una baja calidad del esperma.

Otras alteraciones descritas son la vascularización anormal de la retina⁷² y anomalías cardíacas⁷³.

4.2. Alteraciones cromosómicas

Es conocido que hasta en un 60% de los abortos espontáneos el feto presenta

tions in infants born after IVF: a population-based study». *Human Reproduction* 16, 2001, 504-509.

⁷¹ Wennerholm, U.B., Bergh, C., Hamberger, L., Lundin, K., Nilsson, L., Wikland, M., Källén, B. «Incidence of congenital malformations in children born after ICSI». *Human Reproduction* 15, 2000, 944-948. Silver, R.I., Rodriguez, R., Chang, T.S.K., Gearhart, J.P. «*In vitro* fertilization is associated with an increased risk of hypospadias». *Journal of Urology* 161, 1999, 1954-1957. Fredell, I., Kockum, I., Hansson, E., Holmner, S., Lundquist, L., Lackgren, G., et al. «Hereditary of hypospadias and the significance of low birth weight». *Journal of Urology* 167, 2002, 1423-1427. Funke, S., Flach, E., Kiss, I., Sándor, J., Vida, G., Bódis, J., Ertl, T. «Male reproductive tract abnormalities: More common after assisted reproduction?» *Early Human Development* 86, 2010, 547-550. Fredell, I., Kockum, I., Hansson, E., Holmner, S., Lundquist, L., Lackgren, G., et al. «Hereditary of hypospadias and the significance of low birth weight». *Journal of Urology* 167, 2002, 1423-1427.

⁷² Wikstrand, M.H., Niklasson, A., Stromland, K., Hellstrom, A. «Abnormal vessel morphology in boys born after intracytoplasmic sperm injection». *Acta Paediatrica* 97, 2008, 1512-1517,

⁷³ Budziszewska, P., Włoch, A., Rozmus-Warholin, W., et al. «Heart defects and other anomalies in fetuses conceived by assisted reproduction techniques». *Ginekologia Polska* 78, 2007, 865-868

alteraciones cromosómicas incompatibles con la vida, con gran frecuencia trisomías o pérdidas de cromosomas. Los abortos espontáneos con anomalía cromosómica son más altos en los generados por las TRA que los concebidos naturalmente⁷⁴; es de interés que las pérdidas de cromosomas sexuales fueron mayores (11,69%) en el grupo de los generados por ICSI que en el grupo control (6,45%) y en los generados por la FIV convencional (3,23%). De los generados por ICSI en el 55,71% la causa de infertilidad fue por factor masculino. Resultados similares se obtuvieron al comparar un total de 277 casos de abortos espontáneos en que los fetos se generaron con el uso de TRA. Tienen alteraciones cromosómicas un 63,2% de los procedentes de la FIV convencional, el 71,5% de los engendrados tras tratamiento de estimulación ovárica, el 80% cuando se ha aplicado la ICSI con una extracción directa del espermatozoide de los testículos, y un 85,7% tras inseminación al útero⁷⁵.

El tratamiento por ICSI aporta un riesgo más de tres veces mayor de anomalías cromosómicas que el de los concebidos naturalmente⁷⁶. Los

datos son congruentes: se fuerza la fecundación con la inyección directa al óvulo de un espermatozoide en casos de subfertilidad masculina, que cursa generalmente con alteraciones del material genético.

Se conoce que además de las alteraciones, fundamentalmente heredadas de los gametos paternos, existe riesgo de generar alguna anomalía cromosómica nueva, no presente en los gametos; suponen un 1,6% para los generados por ICSI frente a un 0,5% de los concebidos naturalmente⁷⁷. Estas alteraciones fetales *de novo* consisten fundamentalmente en un incremento del número de cromosomas sexuales, cursan con esterilidad, y sus manifestaciones fenotípicas son indetectables al nacer y en los primeros años de vida. Pueden originarse por el cultivo del embrión⁷⁸.

Las alteraciones cromosómicas del hijo pueden ser debidas también a la edad avanzada de la madre, que se acompaña obviamente de alteraciones de los oocitos, y se manifiesta en aberraciones cromosómicas. Estas alteraciones son mayores tras ICSI respecto a la FIV convencional,

74 Kim, J.W., Lee, W.S., Yoon, T.K., Seok, H.H., Cho, J. H., Kim, Y.S., Lyu, S.W., Shim, S.H. «Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment». *BMC Medical Genetics* 11, 2010, 153-159.

75 Bettio, D., Venci, A., Levi Setti, P.E. «Chromosomal abnormalities in miscarriages after different assisted reproduction procedures». *Placenta* 29, 2008, 126-128.

76 Marjoribanks, J., Farquhar, C., Marshall, C. «Systematic review of the health risks to the mother, child and family associated with the use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI)». *Report to*

the Ministry of Health from the New Zealand Guidelines Group undertaken by the Cochrane Menstrual Disorders and Subfertility, New Zealand, 90 pp., 2005.

77 Bonduelle, M., Van Assche, E., Joris, H., Keymolen, K., Devroey, P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. «Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters». *Human Reproduction* 17, 2002, 2600-2614.

78 Kissin, D.M., Schieve, L.A., Reynolds, M.A. «Multiple birth risk associated with IVF and extended embryo culture: USA, 2001». *Human Reproduction* 20, 2005, 2215-2223.

incluso si la madre es joven⁷⁹.

En los últimos años, la maduración *in vitro* de los oocitos obtenidos por estimulación ovárica ha comenzado a ser un paso de rutina en las TRA. Se ha observado que este proceso no incrementa el riesgo de alteraciones congénitas respecto a los nacidos concebidos naturalmente⁸⁰, excepto cuando la esterilidad femenina se debe a ovario poliquístico. En este caso la maduración de los óvulos *in vitro* lleva consigo pérdidas embrionarias muy altas, tanto si se generan por FIV como por ICSI⁸¹.

4.3. Herencia de las alteraciones que provocan esterilidad paterna, tras el uso de la ICSI

La posibilidad de heredar alteraciones debidas a la esterilidad paterna, cuando se usa la técnica ICSI, parece estar relacionada con la infertilidad subyacente⁸²;

de hecho existe una fuerte correlación entre la constitución cromosómica del embrión y la infertilidad paterna debida a alteraciones cromosómicas.

Parte de la infertilidad masculina está asociada a alteraciones del cromosoma Y, que obviamente heredan los hijos varones⁸³. Actualmente, se cuenta ya con la disección de los genes del cromosoma Y, lo que permite un mejor diagnóstico de la causa de infertilidad y, con el diagnóstico, se podría aportar una información rigurosa a quienes acuden a la ICSI, y valorar con ello las malformaciones esperables en los hijos.

Otras de las causas de esterilidad que se refieren a la no producción de esperma-

79 Gjerris, A.C., Loft, A. Pinborg, A., Christiansen, M., Tabor, A. «Prenatal testing among women pregnant after assisted reproductive techniques in Denmark 1995–2000: a national cohort study». *Human Reproduction* 23, 2008, 1545–1552.

80 Buckett, W.M, Chian, R.C., Holzer, H, Dean, N, Usher, R, Tan, S.L. «Obstetric outcomes and congenital abnormalities after in vitro maturation, in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection». *Obstetrics and Gynecology* 110, 2007, 885–891.

81 Buckett, W.M., Chian, R.-C., Dean, N.L., Sylvestre, C., Holzer, H.E.G., Lin Tan, S. «Pregnancy loss in pregnancies conceived after in vitro oocyte maturation, conventional in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility* 90, 2008, 546–550.

82 Shevell, T., Malone, F.D., Vidaver, J., Porter, T.F., Luthy, D.A., Comstock, C.H., *et al*, for the FASTER Research Consortium. «Assisted reproductive technology and pregnancy outcome». *Obstetrics and Gynecology* 106, 2005, 1039–1045. Zadori J, Kozinszky A, Porvos H, Katona M, Kaali SG, P. *et*

al. «The incidence of major birth defects following in vitro fertilization». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 20, 2003, 131–132. Mau, K.C., Jul, A., Main, K.M., Loft, A. «Children conceived after intracytoplasmic sperm injection (ICSI): is there a role for the paediatrician?» *Acta Paediatrica* 93, 2004, 1238–1244. Kurinczuk, J.J., Hansen, M., Bower, C. «The risk of birth defects in children born after assisted reproductive technologies». *Current opinion in Obstetrics and Gynecology* 16, 2004, 201–209. Rodrigo, L., Peinado, V., Mateu, E., Remon J., Pellicer, A., Simon, C., Gil-Salom, M., Rubio, C. «Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 1380–1386.

83 Katagiri, Y., Neri, Q.V., Takeuchi, T., Schlegel, P.N. «Y chromosome assessment and its implications for the development of ICSI children». *Reproductive Biomedicine Online* 3, 2004, 307–318. Tiepolo, L., Zuffardi, O. «Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm». *Human Genetics* 34, 1976, 119–124. Reijo, R., *et al.* «Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome». *Lancet* 347, 1996, 1290–1293.

tozoides –azoospermia– baja producción o moderada –oligozoospermia– y que han requerido la ICSI para concebir, tenían alguna reordenación cromosómica. La frecuencia en los tres tipos citados fue de 18,71%, 14,55%, y 2,37%, respectivamente⁸⁴.

En tercer lugar, un 6% de los varones estériles tienen un cariotipo con anomalías del tipo de trisomías –tres en vez de un par– de los cromosomas sexuales, poco frecuentes. Por ejemplo el síndrome de Klinefelter, que ocurre en 1 por 500 de los varones, afecta al 14% de los hombres con azoospermia no-obstructiva. En otros casos se trata de reordenaciones cromosómicas, cambios de sitio de genes, inversiones de algunas regiones del ADN, o pérdida de zonas. Las TRA provocan que se transmitan a la descendencia enfermedades genéticas⁸⁵.

Se ha confirmado que las mutaciones genéticas que causan la fibrosis quística, y cursan con ausencia de vasos deferentes, se transmiten a los hijos generados por las TRA⁸⁶.

Se han descrito también alteraciones epigenéticas en el espermatozoides de baja movilidad⁸⁷ y también errores intrínsecos de

la impronta en el espermatozoides de hombres con producción espermática normal⁸⁸. En tipos de infertilidad femenina, que afecta a los genes con impronta, se puede transmitir a los hijos al sobrepasar con las TRA la barrera de selección de la fecundación⁸⁹.

Por otra parte, se han descrito alteraciones de las hormonas sexuales en los generados por ICSI, cuyas consecuencias en el presente y para las generaciones futuras no dejan de ser alarmantes⁹⁰.

Es imprescindible llevar a cabo un análisis riguroso de las causas de la esterilidad masculina, para los que acuden a la aplicación de la TRA; y es imprescindible desaconsejarla en caso de cualquier tipo de alteración no sólo de los cromosomas sino del estado del ADN, que debe corresponder a la situación de maduración.

84 Gekas, J. *et al.* «Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men». *Human Reproduction* 16, 2001, 82–90.

85 Lipshultz, L.L., Lamb, D.J. «Risk of transmission of genetic diseases by assisted reproduction». *Nature Clinical Practice Urology* 4, 2007, 460–461.

86 Patrizio, P., Asch, R.H., Handelin, B., Silber, S.J. «Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations». *Human Reproduction* 8, 1993, 215–220.

87 Pacheco, S.E., Houseman, E.A., Christensen, B.C., Marsit, C.J., Kelsey, K.T., Sigman, M., Boekel-

heide, K. «Integrative DNA Methylation and Gene Expression Analyses Identify DNA Packaging and Epigenetic Regulatory Genes Associated with Low Motility Sperm». *PLoS ONE* 6, 2011, e20280. Cox, G.F., Burger, J., Lip, V., Mau, U.A., Sperling, K., Wu, B.L., *et al.* «Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects». *American Journal of Human Genetics* 71(1), 2002, 162–164.

88 Marques, C.J., Francisco, T., Sousa, S., Carvalho, F., Barros, A., Sousa, M. «Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 585–594.

89 Tierling, S., Souren, N.Y., Gries, J., Loporto, C., Groth, M., Lutsik, P., *et al.* «Assisted reproductive technologies do not enhance the variability of DNA methylation imprints in human». *Journal of Medical Genetics* 47, 2010, 371–376.

90 Mau, K.C., Main, K.M., Andersen, A.N., Loft, A., Skakkebaek, N.E., Juul, A. «Reduced serum testosterone levels in infant boys conceived by intraplasmatic sperm injection». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92, 2007, 2598–2603.

5. Defectos del feto temprano

Los defectos congénitos clasificados como «defectos de blastogénesis» tienen lugar en las 4 primeras semanas de desarrollo del embrión. Se producen al inicio de la formación de los diversos órganos y tienden, por tanto, a afectar la formación de zonas concretas del feto que se están desarrollando en esos momentos. Originan defectos del tubo neural, de la pared abdominal, atresia esofágica y atresia anal y son más frecuentes en los embriones generados por las TRA, tanto en únicos como en gemelos⁹¹. Son graves, y muchos de los abortos espontáneos presentan este tipo de malformación. No tienen causa genética y son más frecuentes en los nacidos tras uso de la FIV y la ICSI⁹². Están presentes en 1 de cada 160 embarazos de TRA en comparación con 1 por cada 400 de los controles, lo que plantea que sean debidos al cambio del entorno natural por el medio ambiente en que se desarrolla el embrión con las TRA.

Tanto las exposiciones relacionadas con la estimulación ovárica, la recogida

de oocitos y el cultivo de embriones tienen probabilidades de influir en el desarrollo temprano del embrión⁹³, y en su implantación. El tratamiento de estimulación ovárica conlleva un nivel más bajo de la proteína endometrial del embarazo, PAPP-A, que desempeña un papel clave en la formación de vasos y en la formación de la placenta en las primeras semanas del embarazo. También tiene relevancia en cuanto a que esta proteína se usa en el diagnóstico de fetos con Síndrome de Down, dando lugar a falsos positivos⁹⁴.

Otro efecto negativo de la aplicación de las TRA en el desarrollo temprano del embrión es el hecho de que hacen perder el control de la expresión de genes con impronta, que son esenciales en este periodo. Como se ha comentado, la causa de que se pierda el control de estos genes puede ser múltiple⁹⁵.

93 Shih, W., Rushford, D.D., Bourne, H., Garrett, C., McBain, J.C., Healy, D.L., Baker, H.W. «Factors affecting low birth weight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection». *Human Reproduction* 23, 2008, 1644–1653.

94 Amor, D.J., Xu, J.X., Halliday, J.L., Francis, I., Healy, D.L., Breheny, S., Baker, H.W., Jaques, A.M. «Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome». *Human Reproduction* 24, 2009, 1330–1338.

95 Entre otros: Bowdin, S., Allen, C., Kirby, G., Brueton, L., Afnan, M., Barratt, C., *et al.* «A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders» *Human Reproduction* 22, 2007, 3237–3240. Chason, R.J., Csokmay, J., Segars, J.H., Decherney, A.H., Armant, D.R. «Environmental and epigenetic effects upon preimplantation

91 Aston, K.I., Peterson, C.M., Carrell, D.T. «Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review». *Reproduction* 136, 2008, 377–386. Reefhuis, J., Honein, M.A., Schieve, L.A., Correa, A., Hobbs, C.A., Rasmussen, S.A., the National Birth Defects Prevention. «Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States». *Human Reproduction* 24 (2), 2005, 360–366.

92 Halliday, J. L., Ukoumunne, O.C., Baker, H.W.G., Breheny, S., Garrett, C., Healy, D., Amor, D. «Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies». *Human Reproduction* 25, 2010, 59–65.

6. Síndromes raros, y riesgo de cáncer por mutaciones epigenéticas

Existen algunos síndromes, relacionados con la expresión aberrante de los genes con impronta, muy poco frecuentes en la población general y que, sin embargo, se han visto con frecuencia en los niños nacidos tras las técnicas reproducción asistida.

a) El *síndrome Beckwith-Wiedemann* se caracteriza por nacimiento prematuro, lengua anormalmente larga, hernia umbilical, hipoglucemia neonatal y predisposición a tumores⁹⁶ y mayor frecuencia del tumor de Wilms, un raro tumor que afecta a uno de cada 36.000 nacidos⁹⁷. Existe una clara asociación entre el sín-

drome Beckwith-Wiedemann y los pacientes concebidos por TRA⁹⁸.

El 90% de los niños con el síndrome Beckwith-Wiedemann, nacidos por uso de las TRA, tienen defectos concretos de la impronta, consistente en la pérdida de las marcas epigenéticas en la región KvDMR –dentro de KCNQ1– de la copia materna del cromosoma 11⁹⁹. Este mismo

embryo metabolism and development». *Trends in Endocrinology and Metabolism* 22 (10), 2011, 412-420. Georgiou, I., Syrrou, M., Pardalidis, N., Karakitsios, K., Mantzavinos, T., Giotitsas, N., Loutradis, D., Dimitriadis, F., Saito, M., Miyagawa, I., Tzoumis, P., Sylakos, A., Kanakas, N., Moustakareas, T., Baltogiannis, D., Touloupides, S., Giannakis, D., Fatouros, M., Sofikitis, N. «Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method». *Asian Journal of Andrology* 8, 2006, 643-673. Sutcliffe, A.G., Peters, C.J., Bowdin, S., Temple, K., Reardon, W., Wilson, L., et al. «Assisted reproductive therapies and imprinting disorders—a preliminary British survey». *Human Reproduction* 21, 2006, 1009-1011. Thompson, J.R., Williams, C.J. «Genomic imprinting and assisted reproductive technology: connections and potential risks». *Seminars in Reproductive Medicine* 23, 2005, 285-295.

96 DeBaun, M.R., Tucker, M.A. «Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry». *The Journal of Pediatrics* 132, 1998, 398-400.

97 Lucifero, D., Chaillet, J.R., Trasler, J.M. «Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology». *Human Reproduction Update* 10(1), 2004, 3-18

98 Halliday, J., Oke, K., Breheny, S., Algar, E., Amor, D.J. «Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study». *American Journal of Human Genetics* 75(3), 2004, 526-528. Lim, D., Bowdin, S.C., «Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies». *Human Reproduction* 24, 2009, 741-747. Maher, E.R., Brueton, L.A., Bowdin, S.C., Luharia, A., Cooper, W., Cole, T.R., Macdonald, F., Sampson, J.R., Barratt, C.L., Reik, W., Hawkins, M.M. «Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART)». *Journal of Medical Genetics* 40, 2003, 62-64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1394>. Lim, D., Bowdin, S.C., «Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies». *Human Reproduction* 24, 2009, 741-747. Manipalviratn, S., DeCherney, A., Segars, J. «Imprinting disorders and assisted reproductive technology» *Fertility and Sterility* 91, 2009, 305-315.

99 Beatty, L., Weksberg, R., Sadowski, P.D. «Detailed analysis of the methylation patterns of the KvDMR1 imprinting control region of human chromosome 11». *Genomics* 87, 2006, 46-56. Geuns, E., Hilven, P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., De Rycke, M. «Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes». *Journal of Medical Genetics* 44, 2007, 144-147. Gicquel, C., Gaston, V., Mandelbaum, J., Sifroi, J.P., Flahault, A., Le Bouc, Y. «In vitro fertilisation may increase the risk of Beck-Weidemann Syndrome related to the abnormal imprinting of the KNCQ1OT gene». *American Journal of Human Genetics* 72, 2003, 1338-1341. Beatty, L., Weksberg, R., Sadowski, P.D. «Detailed analysis of the methylation patterns of the KvDMR1 imprinting control region of human chromosome 11». *Genomics* 87, 2006, 46-56. Smilnich, N.J., Day, C.D., Fitzpatrick, G.V., Caldwell, G.M., Lossie, A.C., Cooper, P.R., Smallwood, A.C., Joyce,

cambio de la impronta lo comparten con el 40-50% de los que padecen el síndrome y habían sido engendrados naturalmente¹⁰⁰. En los concebidos por las TRA parecen existir otras epimutaciones más, una de ellas ligada a la ICSI¹⁰¹ y cualquiera de ellas afecta a la regulación de genes concretos.

Un ejemplo conocido es el gen con impronta, *Igf2r* -el receptor del factor de crecimiento derivado de insulina- que se

relaciona directamente con un exceso de crecimiento y que en ovinos generados *in vitro* se ha visto relacionado con una modificación consistente en pérdida de metilación¹⁰²

b) Los pacientes con el síndrome de Angelman tienen pérdida o alteraciones del patrón de metilación. En este caso, en el cromosoma 15, en la región SNRPN, también de la copia materna, lo que sugiere, que como en el caso anterior, la mutación epigenética esté relacionada con una mayor vulnerabilidad del oocito obtenido del ovario estimulado y madurado *in vitro*. De hecho, la impronta de SNRPN de la copia materna se establece en la fecundación, o incluso más tarde¹⁰³.

El síndrome de Angelman se caracteriza por retraso mental grave, deterioro del habla, trastorno del equilibrio y un comportamiento «feliz y nervioso»; incluye también un crecimiento excesivo prenatal, y defectos de la pared abdominal. La frecuencia es de aproximadamente uno de cada 10.000 a 30.000 de la población. Se relaciona con las TRA, especialmente con la aplicación de la ICSI a parejas

J.A., Schoeld, P.N., Reik, W. *et al.* «A maternally methylated CpG island in KCNQ1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome». *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 96, 1999, 8064-8069.

100 Engel, J.R., Smallwood, A., Harper, A., Higgins, M.J., Oshimura, M., Reik, W., Schoeld, P.N., Maher, E.R. «Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome». *Journal of Medical Genetics* 37, 2000, 921-926. Lee, M.P., DeBaun, M.R., Mitsuya, K., Galonek, H.L., Brandenburg, S., Oshimura, M., Feinberg, A.P. «Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KCNQ1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1999, 5203-5208. Gomes, M.V., Huber, J., Ferriani, R.A., Amaral Neto, A.M., Ramos, E.S. «Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies». *Molecular Human Reproduction* 15, 2009, 471-477.

101 Chang, A.S., Moley, K.H., Wangler, M., Feinberg, A.P., DeBaun, M.R. «Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients». *Fertility and Sterility* 83, 2005, 349-354. Rossignol, S., Steunou, V., Chalas, C., Kerjean, A., Rigolet, M., Viegas-Pequignot, E., Jouannet, P., Le Bouc, Y., Gicquel, C. «The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region». *Journal of Medical Genetics* 43, 2006, 902-907.

102 Young, L.E., Fernandes, K., McEvoy, T.G., Butterwith, S.C., Gutierrez, C.G., Carolan, C., Broadbent, P.J., Robinson, J.J., Wilmut, I., Sinclair, K.D. «Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture». *Nature Genetics* 27, 2001, 153-154.

103 El-Maarri, O., Buiting, K., Peery, E.G., Kroisel, P.M., Balaban, B., Wagner, K., Urman, B., Heyd, J., Lich, C., Brannan, C.I., Walter, J. and Horsthemke, «Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization». *Nature Genetics* 27, 2001, 341-344.

subfértiles¹⁰⁴; aunque, es evidente que la ICSI *per se* no es el principal determinante de la asociación observada entre las TRA y los trastornos de la impronta, sino más bien la estimulación ovárica¹⁰⁵.

c) Se han descrito otros síndromes raros que se asocian a las TRA especialmente en gemelos de ICSI: el de Goldenhar, y el de Rubinstein-Taybi, el síndrome de Meckel-Gruber y retraso mental¹⁰⁶.

d) Un solo artículo –que no ha sido confirmado– refleja un riesgo mayor de sufrir el tumor infantil retinoblastoma en los niños nacidos por FIV; un tumor poco frecuente que se presenta en un niño por

17.000¹⁰⁷. Un meta análisis¹⁰⁸ ha detectado un incremento del riesgo de cáncer en los niños generados por las TRA.

e) Se ha descrito un aumento de secuelas neurológicas, como retraso mental y graves defectos de visión¹⁰⁹. La preocupación por secuelas a largo plazo del uso de las TRA, como los problemas de desarrollo neurológico, hace que se plantee exigir a los investigadores que presten más atención¹¹⁰.

107 Moll, A.C., Imhof, S.M., Cruysberg, J.R.M., Schouten-van Meeteren, A.Y.N. *et al.* «Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation». *Lancet* 361, 2003, 309-310.

108 Raimondi, S., Pedotti, P., Taioli, E. «Meta-analysis of cancer incidence in children born after assisted reproductive technologies». *British Journal of Cancer* 93, 2005, 1053–1056. Källén, B., Finnström, O., Karl-Gösta, N., Otterblad Olausson, P. «In vitro fertilization in Sweden: child morbidity including cancer risk». *Fertility and Sterility* 84, 2005, 605–610.

109 Strömberg, B., Dahlquist, G., Ericson, A., Finnström, O., Köster, M., Stjernqvist, K. «Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population based study». *Lancet* 359, 2002, 461-465. Bonduelle, M., Ponjaert, I., Van Steirteghem, A., Derde, M.P., Devroey, P., Liebaers, I. «Developmental outcome at 2 years of age for children born after ICSI compared with children born after IVF». *Human Reproduction* 18, 2003, 342-350.

110 Olivennes, F., Ramogidas, S., Golombok, S. «Children's cognitive development and family functioning in a large population of IVF/ICSI twins». *Fertility and Sterility* 82 (Supplement 2), 2004, S37-S37. Ponjaert-Kristoffersen, I., Bonduelle, M., Barnes, J., Nekkebroeck, J., Loft, A., Wennerholm, U.B., *et al.* «International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, *in vitro* fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments». *Pediatrics* 115, 2005, e283–e289. Schieve, L.A., Rasmussen, S.A., Buck, G.M., Schendel, D.E., Reynolds, M.A., Wright, V.C. «Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes?». *Obstetrics and Gynecology* 103, 2004, 1154–1163.

104 Ørstavik, K.H., Eiklid, K., van der Hagen, C.B., Spetalen, S. *et al.* «Another case of imprinting defect in a girl with Angelman Syndrome who was conceived by intracytoplasmic sperm injection». *American Journal of Human Genetics* 72, 2003, 218-219. Ludwig, M. «Are adverse outcomes associated with assisted reproduction related to the technology or couples' subfertility?». *Nature Clinical Practice Urology* 6, 2009, 8-16.

105 Kanber, D., Buiting, K., Zeschnigk, M., Ludwig, M., Horsthemke, B. «Low frequency of imprinting defects in ICSI children born small for gestational age». *European Journal of Human Genetics* 17, 2009, 22–29.

106 Balci, S., Engiz, O., Alikasifoglu, M., Esinler, I., Sinan Beksac, M. «Association of assisted reproductive technology with twinning and congenital anomalies». *Indian Journal of Pediatrics* 75, 2008, 638–640. Celentano, C., Prefumo, F., Liberati, M., Gallo, G., Di Nisio, Q., Rotmensch, S. «Prenatal diagnosis of Meckel-Gruber syndrome in a pregnancy obtained with ICSI». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 23, 2006, 281–283. Mihci, E., Guney, K., Velipasaoglu, S. «DOOR (deafness, onychodystrophy, osteodystrophy, mental retardation) syndrome in one of the twins after conception with intracytoplasmic sperm injection». *American Journal of Medical Genetics A* 146, 2008, 1483–1485.

f) Como era de esperar, los gestados únicos tienen menores riesgos de alteraciones de la impronta, así como de otros problemas que los gemelos o trillizos¹¹¹

7. Epimutaciones en el genoma originadas por el uso de las TRA que se manifiestan a largo plazo y/o se transmiten a las siguientes generaciones

Hay problemas de salud que aparecen a largo plazo por lo que no son detectables por los estudios sistemáticos que analizan la salud al nacimiento, o a corto plazo de la vida de los nacidos. Algunos defectos tempranos prevalecen a lo largo de la vida como el asma y enfermedades alérgicas¹¹². Y, actualmente hay evidencia de que las mutaciones epigenéticas en los nacidos por las TRA generan alteraciones a largo plazo¹¹³.

111 Li, S.J., Ford, N., Meister, K., Bodurtha, J. «Increased risk of birth defects among children from multiple births». *Birth Defects Research. Part A. Clinical and Molecular Teratology* 67, 2003, 879-885. Yoon, G., Beischel, L.S., Johnson, J.P., Jones, M.C. «Dizygotic twin pregnancy conceived with assisted reproductive technology associated with chromosomal anomaly, imprinting disorder, and monochorionic placentation». *The Journal of Pediatrics* 146, 2005, 565-567. Tang, Y., Ma, C.X., Cui, W., Chang, V., Ariet, M., Morse, S.B., Resnick, M.B., Roth, J. «The risk of birth defects in multiple births: a population-based study». *Maternal and Child Health Journal* 10, 2006, 75-81. Lidgaard, Ø., Pinborg, A., Andersen, A.N. «Imprinting disorders after assisted reproductive technologies». *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 18, 2006, 293-296.

112 Cetinkaya, F. Gelen, S.A., Kervancioglu, Oral, E.E. «Prevalence of asthma and other allergic diseases in children born after in vitro fertilisation». *Allergologia et Immunopathologia* 37, 2009, 11-13.

113 Grace, K.S., Sinclair, K.D. «Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking». *Seminars in Reproductive Medicine* 27, 2009, 409-416.

Es importante señalar que las epimutaciones pueden ser heredadas de los gametos o pueden generarse *de novo* en los primeros estadios del desarrollo embrionario. La epimutación se genera en los procesos de transmisión de la vida, aunque el defecto correspondiente aparecerá a corto o a largo plazo. Está bien establecida la asociación entre las influencias ambientales y los trastornos en los orígenes de cada individuo¹¹⁴

De hecho, en las células diferenciadas del organismo, la reprogramación epigenética es muy reducida, y generalmente estable: el 80% de los sitios de metilación permanece metilados¹¹⁵. El efecto de la posible epimutación que puede aparecer, por ello, más tarde y afectar a la función del órgano correspondiente no se transmite a las generaciones siguientes, a diferencia de las epimutaciones de las células de la línea germinal, que se pueden transmitir, aunque el individuo en que se ha generado tenga características, o fenotipo, normales¹¹⁶.

7.1. Problemas cardiovasculares por la aplicación de las TRA

Los trabajos con ratones¹¹⁷ han docu-

114 Barker, D.J. «The origins of the developmental origins theory». *Journal Inter. Medicine* 261, 2007, 412-417.

115 Feil R. «Epigenetic. Ready for the marks». *Nature* 461, 2009, 359-360.

116 Jablonka, E., Raz, G. «Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution». *Quarterly Review of Biology* 84, 2009, 131-176.

117 Rexhaj, E., Giacobino, A., Nicod, P., Germond, M., Sartori, C., Sherrer, U. «Mice generated by assisted reproductive technologies, a model organism for the study of epigenetic mechanisms

mentado que la tecnologías de la TRA, especialmente el medio de cultivo, alteran los patrones de metilación y con ello la expresión de los genes, asociándose con la disfunción vascular y la hipertensión en la descendencia.

Se había descrito anteriormente que esta alteración puede vincularse a diversos factores¹¹⁸. En 2010, se conoció el riesgo tres veces mayor de defectos congénitos del corazón, a largo plazo, de los generados por FIV/ICSI respecto a los concebidos naturalmente¹¹⁹; el tipo de controles y variables usadas en este trabajo sugieren que este problema no está relacionado con factores de los padres sino con las técnicas en sí. Sin embargo, en 2012 se confirma no sólo el riesgo, a largo plazo de enfermedad cardiovascular, sino que además la causa es la exposición del embrión *in vitro*

a un entorno adverso¹²⁰. Demuestran la incidencia de niños de entre 8 y 18 años, concebidos por las técnicas de FIV, de disfunción vascular generalizada con las características estructurales y funcionales que se vinculan a un mayor riesgo de eventos cardiovasculares en la edad adulta. Para ello han tomado como controles de los 65 jóvenes que fueron generados *in vitro*, a hermanos de ellos engendrados naturalmente, y otros engendrados también después de que la madre tuviera un tratamiento de estimulación ovárica, indispensable en la fecundación *in vitro*.

7.2. Otras epimutaciones

Estudios recientes sugieren que cambios, casi inapreciables del patrón de metilación, se pueden producir en cualquier sitio del genoma, en los generados por las TRA y pasar a la descendencia¹²¹; además

of vascular dysfunction in vivo». *Circulation* 122, 2010, A19117. Rexhaj, E., Bloch, J., Jayet, P.Y., Rimoldi, S.F., Dessen, P., Mathieu, C., Tolsa, J.F., Nicod, P., Scherrer, U., Sartori, C. «Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: role of epigenetic mechanisms». *American Journal of Physiology. Heart Circulation Physiology* 301, 2011, H247–H252.

118 Basatemur, E., Sutcliffe A. «Follow-up of Children Born after ART». *Placenta* 29, 2008, S135–S140. Ceelen, M. van Weissenbruch, M.M., Vermeiden, J.P.W., van Leeuwen, F.E., Delemarrevan de Waal, H.A. «Cardiometabolic Differences in Children Born After *in Vitro* Fertilization: Follow-Up Study». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93, 2008, 1682–1688.

119 Wen, S.W., Leader, A., White, R.R., Leveille, M.C., Wilkie, V., Zhou, J., Walker, M.C. «A comprehensive assessment of outcomes in pregnancies conceived by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection» *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 150, 2010, 160–165.

120 Scherrer, U., Rimoldi, S.F. Rexhaj, E. Stuber, T., Duplain, H., Garcin, S., de Marchi, S.F., Nicod, P., Germond, M., Allemann, Y., Sartori, C. «Systemic and Pulmonary Vascular Dysfunction in Children Conceived by Assisted Reproductive Technologies». *Circulation* 125, 2012, 1890–1896 (comentario al artículo: Celermajer, D.S. «Manipulating Nature Might There Be a Cardiovascular Price to Pay for the Miracle of Assisted Conception?» *Circulation* 125, 2012, 1832–1834).

121 Batcheller, A., Cardozo, E., Maguire, M., DeCherney, A.H., Segars, J.H. «Are there subtle genome-wide epigenetic alterations in normal offspring conceived by assisted reproductive technologies?» *Fertility and Sterility* 96, 2011, 1306–1311; Katari S, Turan N, Bibikova M, et al. «DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo». *Human Molecular Genetics* 18, 2009, 3769–3778. Zechner, U., Plushch, G., Schneider, E., El Hajj, N., Tresch, A., Shufaro, Y., et al. «Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy

epimutaciones en genes con impronta¹²² y pérdidas selectivas de metilación¹²³.

Diversos trabajos ponen de manifiesto que, a veces, las condiciones adversas en la vida prenatal se asocian posteriormente con el desarrollo de enfermedades crónicas en la vida adulta¹²⁴. Por ejemplo, se ha descrito que la descendencia de padres expuestos a la hambruna en la época de la concepción, muestran alterados genes con impronta como el factor de crecimiento derivado de la insulina¹²⁵.

Las epimutaciones de genes, después de las TRA, se han asociado a las altera-

ciones cardiovasculares y metabólicas, y podrían tener implicaciones para el futuro: cambios de la presión arterial, aumento de los triglicéridos, glucosa alta en ayunas, aumento de tejido adiposo periférico y aumento en la incidencia de la forma subclínica primaria de hipotiroidismo. Las chicas adolescentes generadas por FIV, tienen desequilibrios hormonales¹²⁶. Estos cambios podrían dar lugar a una predisposición a enfermedades tales como la diabetes tipo II, obesidad y enfermedad cardiovascular¹²⁷.

losses after ART and spontaneous conception». *Molecular Human Reproduction* 16, 2010, 704–713.

122 Katagiri, Y., Aoki, C., Tamaki-Ishihara, Y., Fukuda, Y., Kitamura, M., Matsue, Y., et al. «Effects of assisted reproduction technology on placental imprinted gene expression». *Obstetrics and Gynecology International* 2010 Article ID 437528, 4 pages, doi:10.1155/2010/437528. Guo, L., Choufani, S., Ferreira, J., Smith, A., Chitayat, D., Shuman, C., et al. «Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae». *Developmental Biology* 320, 2008, 79–91. Turan, N., Katari, S., Gerson, L.F., Chalian, R., Foster, M.W., Gaughan, J.P., et al. «Inter- and intra-individual variation in allele-specific DNA methylation and gene expression in children conceived using assisted reproductive technology». *PLoS Genetics* 6, 2010, e100103345.

123 Mann, M.R., Lee, S.S., Doherty, A.S., Verona, R.I., Nolen, L.D., Schultz, R.M., et al. «Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture». *Development* 131, 2004, 3727–3735.

124 Lillycrop, K.M., Burdige, K.A., Gluckman, G.C., Hanson, M.A. «Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease». *Pediatric Research* 61, 2007, 5–10.

125 Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., Lumey, L.H. «Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2008, 17046–17049.

126 Ceelen, M., van Weissenbruch, M.M., Roos, J.C., Vermeiden, J.P. W., van Luwen, F.E., Delemarre-van de Waal, H.A. «Body composition in children and adolescents born after *in vitro* fertilization or spontaneous conception». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92, 2007, 3417–3423. Sakka, S.D., Malamitsi-Puchner, A., Loutradis, D., Chrousos, G.P., Kanaka-Gantenbein, C. «Euthyroid hyperthyrotropinemia in children born after *in vitro* fertilization». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94, 2009, 1338–1341. Sakka, S.D., Loutradis, D., Kanaka-Gantenbein, C., Margeli, A., Papastamataki, M., Papassotiiriou, I., et al. «Absence of insulin resistance and low-grade inflammation despite early metabolic syndrome manifestations in children born after *in vitro* fertilization». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 1693–1699. Ceelen, M., van Weissenbruch M.M., Vermeiden, J.P. W. van Leeuwen, F. E., Delemarre-van de Waal, H.A. «Growth and development of children born after *in vitro* fertilization». *Fertility and Sterility* 90, 2008, 1662–1673. Ceelen, M., and cols. *Op. cit.* 110. Ceelen, M., Mirjam, M.M, Prein, J., Smit, J.J., Vermeiden, J.P., Spreuwenberg, M., van Leeuwen, F.E., Delemarre-van de Waal, H.A. «Growth during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at age 8–18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile parents». *Human Reproduction* 24, 2009, 2788–2795.

127 Wadhwa, P.D., Buss, C., Entringer, S., Swanson, J.M. «Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms». *Seminars in Reproductive Medicine* 27, 2009, 358–368. Watkins, A.J.,

8. Concluyendo

Los datos acerca de la frecuencia de malformaciones, alteraciones cromosómicas, Síndromes raros, y un largo etc., a corto y a largo plazo, en los nacidos con la intervención de algunos de los procesos incluidos en las denominadas Técnicas de Reproducción Asistida, son una llamada de atención, que exige una responsabilidad de los profesionales y de los sistemas de control de los daños. Se requiere una investigación urgente y cuidadosa de la salud de los ya nacidos y una información tanto a los que acuden a las TRA como a la sociedad.

La aplicación de cualquiera de las técnicas de reproducción asistida exige primero un diagnóstico riguroso de la esterilidad o infertilidad de la pareja. Los riesgos para la salud de la descendencia dependen sólo en parte de la calidad de los gametos. En otros casos son sólo las técnicas las causantes de las alteraciones.

El factor masculino es mayoritariamente de origen genético tanto por mutaciones en los genes como por epimutaciones. Esas alteraciones pasan a la descendencia cuando la fecundación se fuerza por inyección de un espermatozoide al citoplasma del óvulo (ISCI). Esta técnica es la más invasiva y la que mayor trastorno origina tanto a corto plazo como a más largo plazo y causan un problema intergeneracional grave. La ISCI debe desaconsejarse, e incluso negarse, si el diagnóstico de infertilidad masculina es

genético. Sin embargo, es la más usada no sólo en casos de subfertilidad, sino también por indicación del protocolo cuando se va a realizar un diagnóstico genético previo a la implantación del embrión.

El riesgo del uso de las técnicas es mayor cuanto más invasivas son. Es elevado el número de alteraciones epigenéticas (reguladoras de la expresión natural del genoma del embrión) que resultan de la exposición a un ambiente artificial tanto de los oocitos obtenidos por estimulación ovárica, como del medio de cultivo del óvulo fecundado, o la congelación-descongelación y reanimación del embrión previo a la implantación en el útero materno.

Todo esto, como se ha reseñado anteriormente tiene consecuencias directas a corto, medio y largo plazo en la vida del individuo generado por las técnicas. Incluso en cuanto que sean heredables puede causar un problema intergeneracional.

Bibliografía disponible online

- N. López-Moratalla, S. Palacios Ortega. «Retraso de la edad de la procreación, incremento de la infertilidad y aumento del recurso a la reproducción asistida. Consecuencias en la salud de los hijos» *Cuadernos de Bioética* 75, 2011, 259-274 (www.aebioetica.org).
- N. López-Moratalla, M. Lago Fernández-Purón, E. Santiago. «Selección de embriones humanos. Diagnóstico Genético Preimplantación» *Cuadernos de Bioética* 75, 2011, 243-258 (www.aebioetica.org).

Fleming, T.P. «Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter». *Journal of Anatomy* 215, 2009, 52-59.

- N. López-Moratalla. «Objeción de ciencia a Técnicas de Reproducción Asistida». *Objeción de Conciencia, Comisión de Ética y Deontología Médica del Colegio Oficial de Médicos de Valladolid*. 2009, 113-132 (www.arvo.net)
- Pedro José Sánchez Abad , N. López-Moratalla. «Carencias de la comunicación biológica en las técnicas de reproducción asistida» *Cuadernos de Bioética* 70, 2009, 339-355 (www.ae-bioetica.org).
- N. López Moratalla, «Fecundación in vitro y la pérdida en la relación intergametos y en la relación inicial madre-hijo». En *La humanidad in vitro* (Coord. Jesús Ballesteros) Ed. Comares. Granada. 2000. (www.arvo.net).
- Artículos publicados acerca de los riesgos de los niños generados por las TRA**
- Aboulghar, H., Aboulghar, M., Mansour, R., Serour, G., Amin, Y., Al-Inany, H. «A prospective controlled study of karyotyping for 430 consecutive babies conceived through intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility* 76, 2001, 249-253.
- Aittomaki, K., Wennerholm, U.B., Bergh, C., Selbing, A. «Safety issues in assisted reproduction technology». *Human Reproduction* 19(3), 2004, 472-476.
- Adler-Levy, Y., Lunenfeld, E., Levy, A. «Obstetric outcome of twin pregnancies conceived by in vitro fertilization and ovulation induction compared with those conceived spontaneously». *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology* 133, 2007, 173-178.
- Anthony, S., Klemetti, R. et al. «Health of children born as a result of in vitro fertilization». *Pediatrics* 118, 2006, 1819-1827.
- Adegboye, A.R., Heitmann, B. «Accuracy and correlates of maternal recall of birthweight and gestational age». *BJOG* 115, 2008, 886-893.
- Allen, V.M., Wilson, R.D., Cheung, A. «Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology». *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 28, 2006, 220-250.
- Allen, C., Bowdin, S., Harrison, R., Sutcliffe, F., Brueton, A.G., Kirby, L., Kirkman-Brown, G., Barrett, J., Reardon, C., Maher W. «Pregnancy and perinatal outcomes after assisted reproduction: a comparative study» *Irish Journal of Medical Science* 177, 2008, 233-241.
- Alukal, J. P., Lipshultz, L.I. «Safety of assisted reproduction, assessed by risk of abnormalities in children born after use of in vitro fertilization techniques». *Nature Clinical Practice Urology* 5, 2008, 140-150.
- Amor, D.J., Halliday, J. «A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies». *Human Reproduction* 23, 2008, 2826-2834.
- Amor, D.J., Xu, J.X., Halliday, J.L., Francis, I., Healy, D.L., Breheny, S., Baker, H.W., Jaques, A.M. «Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-

- A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome». *Human Reproduction* 24, 2009, 1330–1338.
- Amor, D.J. «Genomic imprinting, small babies and assisted reproduction». *European Journal of Human Genetics* 17, 2009, 1–2.
- Andersen, A.N., Goossens, V., Gianaroli, L., Felberbaum, R., de Mouzon, J., Nygren, K.G. «Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE». *Human Reproduction* 22, 2007, 1513–1525.
- Andersen, A.N., Goossens, V., Ferraretti, A.P., Bhattacharya, S., Felberbaum, R., de Mouzon, J., Nygren, K.G. «Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 23, 2008, 756–771.
- Aston, K.I., Peterson, C.M., Carrell, D.T. «Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review». *Reproduction* 136, 2008, 377–386.
- Azem, F., Many, A., Yovel, I. *et al.* «Increased rate of thrombophilia in women with repeated IVF failures». *Human Reproduction* 19, 2004, 368–370.
- Balci, S., Engiz, O., Alikasifoglu, M., Esinler, I., Sinan Beksac, M. «Association of assisted reproductive technology with twinning and congenital anomalies». *Indian Journal of Pediatrics* 75, 2008, 638–640.
- Batcheller, A., Cardozo, E., Maguire, M., DeCherney, A.H., Segars, J.H. «Are there subtle genome-wide epigenetic alterations in normal offspring conceived by assisted reproductive technologies?» *Fertility and Sterility* 96, 2011, 1306–1311.
- Banerjee, I., Shevlin, M., Taranissi, M., Thornhill, A., Abdalla, H., Ozturk, O., Barnes, J., Sutcliffe, A. «Health of children conceived after preimplantation genetic diagnosis: a preliminary outcome study». *Reproductive Medicine Online* 16, 2008, 376–381.
- Barnes, J., Sutcliffe, A.G., Kristoffersen, I., Loft, A., Wennerholm, U., Tarlatzis, B.C., *et al.* «The influence of assisted reproduction on family functioning and children's socio-emotional development: results from a European study». *Human Reproduction* 19(6), 2004, 1480–1487.
- Basatemur, E., Sutcliffe A. «Follow-up of Children Born after ART». *Placenta* 29, 2008, S135–S140
- Belva F, Henriët S, Van den Abbeel E, *et al.* «Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles». *Human Reproduction* 23, 2008, 2227–2238.
- Belva, F. *et al.* «Medical outcome of 8-year-old singleton ICSI children (born > or =32 weeks' gestation) and a spontaneously conceived comparison group». *Human Reproduction* 22, 2007, 506–515.
- Beral, V., Doyle, P. «Births in Great Britain resulting from assisted conception 1978-1987. Report of the MRC Working Party on children conceived by in-vitro fertilization». *British Medical Journal* 300, 1990, 1229–123.

- Barros, A. «Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis». *Lancet* 363, 2004, 1700–1702.
- Beatty, L., Weksberg, R., Sadowski, P.D. «Detailed analysis of the methylation patterns of the KvDMR1 imprinting control region of human chromosome 11». *Genomics* 87, 2006, 46-56.
- Bergh, T., Ericson A., Hillensjö, T., Nygren, K.G., Wennerholm, U.B. «Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study». *Lancet* 354, 1999, 1579-1585.
- Bettio, D., Venci, A., Levi Setti, P.E. «Chromosomal abnormalities in miscarriages after different assisted reproduction procedures». *Placenta* 29, 2008, 126–128.
- Bonduelle, M., Van Assche, E., Joris, H., Keymolen, K., Devroey, P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. «Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters». *Human Reproduction* 17, 2002, 2600-2614.
- Bonduelle, M., Liebaers, I., Deketelaere, V., Derde, M.P., 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)». *Human Reproduction* 17(3), 2002, 671-694.
- Bonduelle, M., Ponjaert, I., Van Steirteghem, A., Derde, M.P., Devroey, P., Liebaers, I. «Developmental outcome at 2 years of age for children born after ICSI compared with children born after IVF». *Human Reproduction* 18, 2003, 342-350.
- Bonduelle, M., Bergh, C., Niklasson, A., Palermo, G.D., Wennerholm, U.B. «Medical follow-up study of 5-year-old ICSI children». *Reproductive Biomedicine Online* 9(1), 2004, 91-101.
- Bonduelle, M., Wennerholm, U.B., Loft, A., Tarlatzis, B.C., Peters, C., Henriët, S., Mau, C., Victorin-Cederquist, A., Van Steirteghem, A., Balaska, A., Emberson, J.R., Sutcliffe, A.G. «A multi-centre cohort study of the physical conception». *Human Reproduction* 20, 2005, 413-419.
- Borghol, N., Lornage, J., Blachere, T.S., Garret, A., Lefevre, A. «Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation». *Genomics* 87, 2006, 417–426.
- Boulet SL, Schieve LA, Nannini A, *et al.* «Perinatal outcomes of twin births conceived using assisted reproduction technology: a population-based study». *Human Reproduction* 23, 2008, 1941–1948.
- Bowdin, S., Allen, C., Kirby, G., Brue-ton, L., Afnan, M., Barratt, C., *et al.* «A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders» *Human Reproduction* 22, 2007, 3237–3240.
- Bower, C. «Admission to hospital of singleton children born following assisted reproductive technology (ART)». *Human Reproduction* 23, 2008, 1297–1305.
- Buckett, W.M, Chian, R.C., Holzer, H, Dean, N, Usher, R, Tan, S.L. «Obstetric outcomes and congenital abnormalities after in vitro maturation, in vitro fertilization, and intracytoplasmic

- sperm injection». *Obstetrics and Gynecology* 110, 2007, 885–891.
- Buckett, W.M., Chian, R.-C., Dean, N.L., Sylvestre, C., Holzer, H. E. G., Lin Tan, S «Pregnancy loss in pregnancies conceived after in vitro oocyte maturation, conventional in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility* 90, 2008, 546–550.
- Budziszewska, P., Włoch, A., Rozmus-Warcholin, W., et al. «Heart defects and other anomalies in fetuses conceived by assisted reproduction techniques». *Ginekologia Polska* 78, 2007, 865–868.
- Caperton, L., Murphey, P., Yamazaki, Y., McMahan, C.A., Walter, C.A., Yanagimachi, R., McCarrey, J.R. «Assisted reproductive technologies do not alter mutation frequency or spectrum». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2007, 5085–5090.
- Cedergren, M.I., Källén, B.A. «Maternal obesity and infant heart defects». *Obesity Research* 11, 2003, 1065–1071.
- Ceelen, M., van Weissenbruch, M.M., Roos, J.C., Vermeiden, J.P. W., van Luwen, F.E., Delemarre-van de Waal, H.A. «Body Composition in Children and Adolescents Born after *in Vitro* Fertilization or Spontaneous Conception». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92, 2007, 3417–3423.
- Ceelen, M., van Weissenbruch M.M., Vermeiden, J.P. W. van Leeuwen, F. E., Delemarre-van de Waal, H.A. «Growth and development of children born after in vitro fertilization», *Fertility and Sterility* 90, 2008, 1662–1673.
- Ceelen, M., van Weissenbruch, M.M., J.P. W. Vermeiden, Flora E. van Leeuwen, and Henriette A. Delemarre-van de Waal, H.A. «Cardiometabolic Differences in Children Born After *in Vitro* Fertilization: Follow-Up Study». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93, 2008, 1682–1688.
- Ceelen, M. van Weissenbruch, M.M., Vermeiden, J.P.W. van Leeuwen, F.E. Delemarre-van de Waal H A. Cardiometabolic Differences in Children Born After *in Vitro* Fertilization: Follow-Up Study *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93, 2008, 1682–1688.
- Ceelen, M., van Weissenbruch, M.M., Vermeiden, J.P.W., van Leeuwen, F.E., Delemarre-van de Waal, H.A. «Pubertal development in children and adolescents born after IVF and spontaneous conception». *Human Reproduction* 23, 2008, 2791–2798.
- Ceelen, M., Mirjam, M.M, Prein, J., Smit, J.J., Vermeiden, J.P., Spreeuwenberg, M., van Leeuwen, F.E., Delemarre-van de Waal, H.,A. «Growth during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at age 8–18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile parents». *Human Reproduction* 24, 2009, 2788–2795.
- Celentano, C., Prefumo, F., Liberati, M., Gallo, G., Di Nisio, Q., Rotmensch, S. «Prenatal diagnosis of Meckel-Gruber syndrome in a pregnancy obtained with ICSI». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 23, 2006, 281–283.

- Celermajer, D.S. «Manipulating Nature Might There Be a Cardiovascular Price to Pay for the Miracle of Assisted Conception?» *Circulation* 125, 2012, 1832-1834.
- Cetinkaya, F. Gelen, S.A., Kervancioglu, Oral, E.E. «Prevalence of asthma and other allergic diseases in children born after in vitro fertilisation». *Allergologia et Immunopathologia* 37, 2009, 11-13.
- Chang, A.S., Moley, K.H., Wangler, M., Feinberg, A.P., DeBaun, M.R. «Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients». *Fertility and Sterility* 83, 2005, 349-354.
- Chason, R.J., Csokmay, J., Segars, J.H., Decherney, A.H., Armant, D.R. «Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development». *Trends in Endocrinology and Metabolism* 22 (10), 2011, 412-420.
- Clementini, E., Palka, C., Iezzi, I., Stuppia, L. *et al.* «Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques». *Human Reproduction* 20, 2005, 437-42.
- Cohen, J., Mayaux, M.J., Guihard-Moscato, M.L. «Pregnancy outcome after in vitro fertilization. A collaborative study of 2342 pregnancies». *Annals of the New York Academy of Sciences* 541, 1988, 1-6.
- Cohen J. «Infertile couples, assisted reproduction and increased risks to the children». *Reproductive Medicine Online* 15, 2007, 245-246.
- Corveleyn, A., Morris, M.A, Dequeker, E., Sermon, K., Davies, J.L., Antiñolo, G., Schmutzler, A., Vanecek, J., Nagels, N., Zika, E., *et al.* «Provision and quality assurance of preimplantation genetic diagnosis in Europe». *European Journal of Human Genetics* 16, 2008, 290-299.
- Cox, G.F., Burger, J., Lip, V., Mau, U.A., Sperling, K., Wu, B.L., *et al.* «Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects». *American Journal of Human Genetics* 71(1), 2002, 162-164.
- Czeizel, A. «Ovulation induction and neural tube defects». *Lancet* 2, 1989, 167.
- Damgaard, I.N., Jensen, T.K., Nordic Cryptorchidism Study Group, Petersen, J.H., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., *et al.* «Risk factors for congenital cryptorchidism in a prospective birth cohort study». *PLoS One* 3, 2008, e30513.
- D'Angelo, D.V., Whitehead, N., Helms, K.W., Barfield, Ahluwalia, I.B. «Birth outcomes of intended pregnancies among women who used assisted reproductive technology, ovulation stimulation, or no treatment». *Fertility and Sterility* 96, 2011, 314-320.
- Davies, M., Norman, R. «Neurological sequelae in in-vitro fertilisation babies». *Lancet* 360, 2002, 718-719.
- Davies, M.J., Moore, V.M., Willson, K.J., Van Essen, P., Priest, K., Scott, H., Mgmt., B., Haan, E.A., Chan, A. «Reproductive Technologies and the Risk of Birth Defects». *New England Journal of Medicine* 366 (19), 2012, 1803-1813.

- De Baun, M.R., Niemitz, E.L., Feinberg, A.P. «Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19». *American Journal of Human Genetics* 72(1), 2003, 156-160.
- DeBaun, M.R., Niemitz, E.L., McNeil, D.E., Brandenburg, S.A., Lee, M.P., Feinberg, A.P. «Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects» *American Journal of Human Genetics* 70, 2002, 604-611.
- DeBaun, M.R., Tucker, M.A. «Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry». *The Journal of Pediatrics* 132, 1998, 398-400.
- De Mouzon, J., Lancaster, P., Nygren, K.G., Sullivan, E., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Adamson, D. «World collaborative report on assisted reproductive technology 2002». *Human Reproduction* 24, 2009, 2310-2320.
- De Neubourg, D., Gerris, J, Mangelschots, K, *et al.* «The obstetrical and neonatal outcome of babies born after single-embryo transfer in IVF/ICSI compares favorably to spontaneously conceived babies». *Human Reproduction* 21, 2006, 1041-1046.
- De Sutter, P., Bontinck, J., Schutysers, V., *et al.* «First-trimester bleeding and pregnancy outcome after assisted reproduction». *Human Reproduction* 21, 2006, 1907-1911.
- De Rycke, M., Liebaers, I., Van Steirteghem, A. «Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies-Risk analysis and epigenetic inheritance». *Human Reproduction* 17(10), 2002, 2487-2494.
- Delbaere, I., Goetgeluk, S., Derom, C., De Bacquer, D., De Sutter, P., Temmerman, M «Umbilical cord anomalies are more frequent in twins after assisted reproduction» *Human Reproduction* 22, 2007, 2763-2767.
- Denschlag, D., Tempfer, C., Kunze, M., Wolff, G., Keck, C. «Assisted reproductive techniques in patients with Klinefelter syndrome: A critical review». *Fertility and Sterility* 82(4), 2004, 775-779.
- Deneubourg, D., Mangelschots, K., Van Royen, E., *et al.* «Singleton pregnancies are as affected by ovarian hyperstimulation syndrome as twin pregnancies». *Fertility and Sterility* 82, 2005, 1691-1693.
- Dieterich, K., Soto Rifo, R., Faure, A.K., Hennebicq, S., Ben Amar, B., Zahi, M., Perrin, J., Martinez, D., Se'le, B., Jouk, P.S., Ohlmann, T., Rousseaux, S., Lunardi, J., Ray, P.F. «Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility». *Human Reproduction* 22, 2007, 215-220.
- Doyle, P., Beral, V., Maconochie, N. «Pre-term delivery, low birthweight and small-for-gestational-age in liveborn singleton babies resulting from in-vitro fertilization». *Human Reproduction* 7, 1992, 435-428.
- Dolk, H., Loane, M., Garne, E. «The prevalence of congenital anomalies in Europe». *Advances in Experimental Me-*

- dicine and Biology* 686, 2010, 349–364.
- Doornbos, M.E., Maas, S.M., McDonnell, J., Vermeiden, J.P.W., Hennekam, R.C.M. «Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study». *Human Reproduction* 22, 2007, 2476–2480.
- Doyle, P., Beral, V., Maconochie, N. «Pre-term delivery, low birthweight and small-for-gestational-age in liveborn singleton babies resulting from in-vitro fertilization». *Human Reproduction* 7, 1992, 425–428.
- El-Chaar, D., Yang, Q., Gao, J., Bottomley, J., Leader, A., Wen, S.W., Walker, M. «Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction» *Fertility and Sterility* 92, 2009, 1557–1561.
- El-Maarri, O., Buiting, K., Peery, E.G., Kroisel, P.M., Balaban, B., Wagner, K., Urman, B., Heyd, J., Lich, C., Brannan, C.I., Walter, J. and Horsthemke, «Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization». *Nature Genetics* 27, 2001, 341–344.
- Elster, N. «Less is more: the risks of multiple births». *Fertility and Sterility* 74, 2000, 617–623.
- Engel, J.R., Smallwood, A., Harper, A., Higgins, M.J., Oshimura, M., Reik, W., Schoeld, P.N., Maher, E.R. «Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome». *Journal of Medical Genetics* 37, 2000, 921–926.
- Erez, O., Vardi, I.S., Hallak, M., Hershkovitz, R., Dukler, D., Mazor, M. «Preeclampsia in twin gestations: association with IVF treatments, parity and maternal age». *Journal of Maternal-Fetal Neonatal Medicine* 19, 2006, 141–146.
- Ericson, A., Källén, B. «Congenital malformations in infants born after IVF: a population-based study». *Human Reproduction* 16, 2001, 504–509.
- Ericson, A., Nygren, K.G., Olausson, P.O., Källén, B. «Hospital care utilization of infants born after IVF». *Human Reproduction* 17, 2002; 929–932.
- Eugster, A., Vingerhoets, A.J. «Psychological aspects of in vitro fertilization: a review». *Social Science & Medicine* 48, 1999, 575–589.
- Fauque, P., Jouannet, P., Lesaffre, C., Ripoché, M.A., Dandolo, L., Vaiman, D., et al. «Assisted reproductive technology affects development kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos». *BMC Developmental Biology* 18, 2007, 116
- Fedder, J., Gabrielsen, A., Humaidan, P., Erb, K., Ernst, E., Loft, A. «Malformation rate and sex ratio in 412 children conceived with epididymal or testicular sperm». *Human Reproduction* 22, 2007, 1080–1085.
- Feng, C., Wang, L.Q., Dong, M.Y., Huang, H.F. «Assisted reproductive technology may increase clinical mutation detection in male offspring. *Fertility and Sterility* 90, 2008, 92–96.
- Fernandez-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jimenez, A., Perez-Crespo, M., Ramírez, M. A., Rodríguez De Fonseca, F., Pintado, B., Gutierrez-Adan, A. «Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum

- on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2004, 5880–5885.
- Foresta, C., *et al.* «Y chromosome micro-deletions and alterations of spermatogenesis». *Endocrine Reviews* 22, 2001, 226–239.
- Fortunato, A., Tosti, E. «The impact of in vitro fertilization on health of the children: an update» *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 154, 2011, 125–129.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., *et al.* «Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2005, 10604–10609.
- Fredell, I., Kockum, I., Hansson, E., Holmner, S., Lundquist, L., Lackgren, G., *et al.* «Hereditary of hypospadias and the significance of low birth weight». *Journal of Urology* 167, 2002, 1423–1427.
- Freeman, T., Golombok, S., Olivennes, F., Ramogida, C., Rust, J. «Psychological assessment of mothers and their assisted reproduction triplets at age 3 years». *Reproductive Medicine Online* 15, 2007, 13–17.
- Fujii, M., Matsuoka, R., Bergel, E., van der Poel, S., Okai, T. «Perinatal risk in singleton pregnancies after in vitro fertilization» *Fertility and Sterility* 94, 2010, 2113–2117.
- Funke, S., Flach, E., Kiss, I., Sándor, J., Vida, G., Bódis, J., Ertl, T. «Male reproductive tract abnormalities: More common after assisted reproduction?» *Early Human Development* 86, 2010, 547–550.
- Gardner, D.K., Lane, M., Spitzer, A., Batt, P.A. «Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development». *Biology of Reproduction* 50, 1994, 390–400.
- Gaston, V., Mandelbaum, J., Siffroi, J.P., J.P., Flahault, A., Le Bouc, Y. «In vitro fertilisation may increase the risk of Beck-Weidemann Syndrome related to the abnormal imprinting of the KNCQ1OT gene». *American Journal of Human Genetics* 72, 2003, 1341–1346.
- Gaudoin, M., Dobbie, R., Finlayson, A., Chalmers, J., Cameron, I.T. «Ovulation induction/intrauterine insemination in infertile couples is associated with low-birth weight infants». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 188, 2003, 611–636.
- Gekas, J. *et al.* «Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men». *Human Reproduction* 16, 2001, 82–90
- Geraedts, J.P.M., Coonen, E. «Growth rate of human preimplantation embryos is sex dependent after ICSI but not after IVF». *Human Reproduction* 20 (2), 2005, 484–491.
- Georgiou, I., Syrrou, M., Pardalidis, N., Karakitsios, K., Mantzavinos, T., Giotitsas, N., Loutradis, D., Dimi-triadis, F., Saito, M., Miyagawa, I.,

- Tzoumis, P., Sylakos, A., Kanakas, N., Moustakareas, T., Baltogiannis, D., Touloupides, S., Giannakis, D., Fatouros, M., Sofikitis, N. «Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method» *Asian Journal of Andrology* 8, 2006, 643–673.
- Gerson, L.F., Chalian, R., Foster, M.W., Gaughan, J.P., *et al.* «Inter- and intra-individual variation in allele-specific DNA methylation and gene expression in children conceived using assisted reproductive technology». *PLoS Genetics* 6 (7), 2010, e1001033.
- Geuns, E., Hilven, P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., De Rycke, M. «Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes». *Journal of Medical Genetics* 44, 2007, 144–147.
- Gicquel, C., Gaston, V., Mandelbaum, J., Siffroi, J.P., Flahault, A., Le Bouc, Y. «In vitro fertilisation may increase the risk of Beck-Weidemann Syndrome related to the abnormal imprinting of the KNCQ1OT gene». *American Journal of Human Genetics* 72, 2003, 1338–1341.
- Giritharan, G., Talbi, S., Donjacour, A., Di Sebastiano, F., Dobson, A.T., Rinaudo, P.F. «Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos». *Reproduction* 134, 2007, 63–72.
- Gjerris, A.C., Loft, A., Pinborg, A., Christiansen, M., Tabor, A. «Prenatal testing among women pregnant after assisted reproductive techniques in Denmark 1995–2000: a national cohort study». *Human Reproduction* 23, 2008, 1545–1552.
- Gnoth, C., Maxrath, B., Skonieczny, T., Friol, K., Godehardt, E., Tigges, J. «Final ART success rates: a 10 years survey». *Human Reproduction* 26, 2011, 2239–2246.
- Gomes, M.V., Huber, J., Ferriani, R.A., Amaral Neto, A.M., Ramos, E.S. «Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies» *Molecular Human Reproduction* 15, 2009, 471–477.
- Gorkemli, A., Camus, M., Clasen, K. «Adnexal torsion after gonadotrophin ovulation induction for IVF or ICSI and its conservative treatment». *Archives of Gynecology and Obstetrics* 267, 2002, 4–6.
- Guo, L., Choufani, S., Ferreira, J., Smith, A., Chitayat, D., Shuman, C., *et al.* «Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae». *Developmental Biology* 320, 2008, 79–91.
- Grace, K.S., Sinclair, K.D. «Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking». *Seminars in Reproductive Medicine* 27, 2009, 409–416.
- Grandone, E., Colaizzo, D., Vergura, P. *et al.* «Age and homocysteine plasma levels are risk factors for thrombotic complications after ovarian stimulation». *Human Reproduction* 19, 2004, 1706–1799.
- Green, N.S. «Risks of birth defects and other adverse outcomes associated

- with assisted reproductive technology». *Pediatrics*.114, 2004, 256-259.
- Hack, K.E., Derks, J.B., Elias, S.G. «Increased perinatal mortality and morbidity in monochorionic versus dichorionic twin pregnancies: clinical implications of a large Dutch cohort study». *BJOG* 115, 2008, 58–67.
- Halliday, J., Oke, K., Breheny, S., Algar, E., Amor, D.J. «Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study». *American Journal of Human Genetics* 75(3), 2004, 526-528.
- Halliday, J. L., Ukoumunne, O.C., Baker, H.W.G., Breheny, S., Garrett, C., Healy, D., Amor D. «Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. *Human Reproduction* 25, 2010, 59–65.
- Hammer, B.B., Olsen, J., Basso, O. «Infertility, infertility treatment, and fetal growth restriction». *Obstetrics and Gynecology* 110, 2007, 1326–1334.
- Hammadeh, M.E., Ertan, K., Rosenbaum, P., Schmid, W. «Comparison Between Children Born After Natural Conception and Those Born After Assisted Reproduction Technology: A Review of the Literature and Results from our Survey». *Journal of Turkish-German Gynecological Association* 8, 2007, 94-110.
- Hansen, M., Kurinczuk, J.J., Bower, C., Webb, S. «The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization» *New England Journal of Medicine* 346, 2002, 725-730.
- Hansen, M., Bower, C., Milne, E., de Klerk, N., Kurinczuk, J.J. «Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review». *Human Reproduction* 20, 2005, 328–338.
- Hansen, M. et al. «Practitioner reporting of birth defects in children born following assisted reproductive technology: does it still have a role in surveillance of birth defects?» *Human Reproduction* 22, 2007, 516–520.
- Hansen M, Colvin L, Petterson B, Kurinczuk JJ, de Klerk N, Bower C. «Admission to hospital of singleton children born following assisted reproductive technology (ART)». *Human Reproduction* 23, 2008, 1297–1305.
- Hansen, M., Colvin, L., Petterson, B., Kurinczuk, J.J., de Klerk, N., Bower, C. «Twins born following assisted reproductive technology: perinatal outcome and admission to hospital» *Human Reproduction* 24, 2009, 2321–2331.
- Hartmann, S., Bergmann, M., Bohle, R.M., Weidner, W., Steger, K. «Genetic imprinting during impaired spermatogenesis». *Molecular Human Reproduction* 12, 2006, 407–411.
- Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., Lumey, L.H. «Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2008, 17046–17049.
- Helmerhorst, F.M., Perquin, D.A., Donker, D., Keirse, M.J. «Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies». *BMJ* 328, 2004, 261-264.

- Hiendleder, S., Wirtz, M., Mund, C., Klempt, M., Reichenbach, H.D., Stojkovic, M., et al. «Tissue-specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses». *Biology of Reproduction* 75, 2006, 17–23.
- Horsthemke, B. Ludwig, M. «Assisted reproduction: the epigenetic perspective». *Human Reproduction Update* 11, 2005, 473–482.
- Huang, C.T., Au, H.K., Chien, L.W., Chang, C.W., Chien, Y.Y., Tzeng, R. «Twin pregnancy outcome among cases of spontaneous conception, intrauterine insemination, and in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility* 86, 2006, 1017–1019.
- Hvidtjorn, D., Grove, J., Schendel, D.E., Vaeth, M., Ernst, E., Nielsen, L., et al. «Cerebral palsy among children born after *in vitro* fertilization: the role of preterm delivery—a population-based, cohort study». *Pediatrics* 118, 2006, 475–482.
- Hvidtjorn, D., Schieve, L., Schendel, D., Jacobsson, B., Svaerke, C., Thorsen, P. «Cerebral palsy, autism spectrum disorders, and developmental delay in children born after assisted conception: a systematic review and meta-analysis». *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 163, 2009, 72–83.
- Hvidtjorn, D., Grove, J., Schendel, D., Svaerke, C., Schieve L.A., Uldall, P., Ernst E., Jacobsson B., Thorsen, P. «Multiplicity and early gestational age contribute to an increased risk of cerebral palsy from assisted conception: a population-based cohort study» *Human reproduction* 25, 2010, 2115–2123.
- Izat, Y., Goldbeck, L. «The development of children from assisted reproduction—a review of the literature». *Praxis der Kinderpsychologie und Kinderpsychiatrie* 57, 2008; 264–281.
- Kaati, G., Bygren, L.O., Pembrey, M., Sjöström, M. «Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity». *European Journal of Human Genetics* 15, 2007, 784–790.
- Källén, B., Finnstrom, O., Nygren, K.G., Olausson, P.O. «In vitro fertilization (IVF) in Sweden: risk for congenital malformations after different IVF methods». *Birth Defects Research. A Clinical and Molecular Teratology* 73, 2005, 162–169.
- Källén, B., Finnström, O., Karl-Gösta, N., Otterblad Olausson, P. «In vitro fertilization in Sweden: child morbidity including cancer risk» *Fertility and Sterility* 84, 2005, 605–610.
- Källén, B., Finnstrom, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.G. Olausson, P.O. «Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in Sweden». *Birth Defects Research (A)* 88, 2010, 137–143.
- Källén, B., Finnstrom, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.G. Olausson, P.O. «Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years» *Human Reproduction* 25, 2010, 1026–1034.
- Kanaka-Gantenbein, C., Sakka, S., Chrousos, G.P. «Assisted reproduction and its neuroendocrine impact on the

- offspring». *Progress in Brain Research* 182, 2010, 161–174.
- Kanber, D., Buiting, K., Zeschnigk, M., Ludwig, M., Horsthemke, B. «Low frequency of imprinting defects in ICSI children born small for gestational age» *European Journal of Human Genetics* 17, 2009, 22–29.
- Kapiteijn K, de Bruijn CS, de Boer E, *et al.* «Does subfertility explain the risk of poor perinatal outcome after IVF and ovarian hyperstimulation?» *Human Reproduction* 21, 2006, 3228–3234.
- Katagiri, Y., Neri, Q.V., Takeuchi, T., Schlegel, P.N. «Y chromosome assessment and its implications for the development of ICSI children». *Reproductive Biomedicine Online* 3, 2004, 307–318.
- Katagiri, Y., Aoki, C., Tamaki-Ishihara, Y., Fukuda, Y., Kitamura, M., Matsue, Y., *et al.* «Effects of assisted reproduction technology on placental imprinted gene expression». *Obstetrics and Gynecology International* 2010, 2010, Article ID 437528, 4 pages, doi:10.1155/2010/437528.
- Katari S, Turan N, Bibikova M, *et al.* «DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo». *Human Molecular Genetics* 18, 2009, 3769–3778.
- Katalinic, A., Rosch, C., Ludwig, M., German ICSI Follow-Up Study Group. «Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection: a controlled, prospective cohort study». *Fertility and Sterility* 81, 2004, 1604–1616.
- Karpman, E., Williams, D.H., Lipshultz, L.I. «IVF and ICSI in male infertility: update on outcomes, risks, and costs». *The Scientific World Journal* 5, 2005, 922–932.
- Khosla, S., Dean, W., Brown, D., Reik, W., Feil, R. «Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes». *Biology of Reproduction* 64, 2001, 918–926.
- Kim, J.W., Lee, W.S., Yoon, T.K., Seok, H.H., Cho, J. H., Kim, Y.S., Lyu, S.W., Shim, S.H. «Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment». *BMC Medical Genetics* 11, 2010, 153–159.
- Kissin, D.M., Schieve, L.A., Reynolds, M.A. «Multiple birth risk associated with IVF and extended embryo culture: USA, 2001. *Human Reproduction* 20, 2005, 2215–23
- Kjellberg AT, Carlsson P, Bergh C. «Randomized single versus double embryo transfer: obstetric and paediatric outcome and a cost-effectiveness analysis». *Human Reproduction* 21, 2006, 210–216.
- Klemetti, R., *et al.* «Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies». *Fertility and Sterility* 84, 2005, 1300–1307.
- Klemetti, R., Sevon, T., Gissler, M., Hemminki, E. «Health of children born after ovulation induction». *Fertility and Sterility* 93, 2010, 1157–1168.
- Knoester, M., Vandenbroucke, J.P., Helmerhorst, F.M., van der Westerlaken, L.A., Walther, F.J., Veen, S. «Matched follow-up study of 5–8 year old ICSI-singletons: compari-

- son of their neuromotor development to IVF and naturally conceived singletons». *Human Reproduction* 22, 2007, 1638–1646.
- Knoester, M., Helmerhorst, F.M., Vandenbroucke, J.P., Lucette van der Westerlaken, A. J., Walther, F.J., Veen, S «Perinatal outcome, health, growth, and medical care utilization of 5- to 8-year-old intracytoplasmic sperm injection singletons». *Fertility and Sterility* 89, 2008, 1133–1146.
- Kobayashi, H., Sato, O. E. «Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients». *Human Molecular Genetics* 16, 2007, 2542–2551.
- Khosla, S., Dean, W., Reik, W. *et al.* «Epigenetic and experimental modifications in early mammalian development: Part II». *Human Reproduction Update*, 7, 2001, 419-427.
- Kristoffersen, I. «Socio-emotional and language development of 2-year-old children born after PGD/PGS, and parental well-being». *Human Reproduction* 23, 2008, 1849–1857.
- Horsthemke, B. Ludwig, M. «Assisted reproduction: the epigenetic perspective». *Human Reproduction Update* 11, 2005, 473–482.
- Kurinczuk, J.J., Bower, C. «Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation». *British Medical Journal* 315, 1997, 1260-1265.
- Kurinczuk, J.J. «Safety issues in assisted reproduction technology - From theory to reality - just what are the data telling us about ICSI offspring health and future fertility and should we be concerned?» *Human Reproduction* 18(5), 2003, 925-931.
- Kurinczuk, J.J., Hansen, M., Bower, C. «The risk of birth defects in children born after assisted reproductive technologies». *Current opinion in Obstetrics and Gynecology* 16, 2004, 201–209.
- La Sala, G.B.L., Gallinelli, A., Fagandini, A., Bevolo, P. *et al.* «Developmental outcomes at one and two years of children conceived by intracytoplasmic sperm injection». *International Journal of Fertility* 49(3), 2004, 113-119.
- Lambert, R.D. «Safety issues in assisted reproduction technology: the children of assisted reproduction confront the responsible conduct of assisted reproductive technologies». *Human Reproduction* 17, 2002, 3011-3015.
- Lambert, R.D. «Safety issues in assisted reproductive technology: aetiology of health problems in singleton ART babies». *Human Reproduction* 18, 2003, 1987-1991.
- Lancaster, P.A. «Congenital malformations after in-vitro fertilization». *Lancet* 2, 1987, 1392–1393.
- Lancaster, P.A. «Major congenital malformations after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a population-based register». *Fertility and Sterility* 82(Supplement 2), 2004, S45-S45.
- Lee, M.P., DeBaun, M.R., Mitsuya, K., Galonek, H.L., Brandenburg, S., Oshimura, M., Feinberg, A.P. «Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KCNQ1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II im-

- printing». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1999, 5203-5208.
- Lee, S.H., Ahn, S.Y., Lee, K.W., Kwack, K., Jun, H.S., Cha, K.Y. «Intracytoplasmic sperm injection may lead to vertical transmission, expansion, and de novo occurrence of Y-chromosome microdeletions in male fetuses». *Fertility and Sterility* 85, 2006, 1512-1515.
- Leese, H.J., Donnay, I., Thompson, J.G. «Human assisted conception: a cautionary tale: lessons from domestic animals». *Human Reproduction* 13, 1998, 184-202.
- Leslie, G.I. «Mental development of children conceived using intracytoplasmic sperm injection. The current evidence». *Minerva Ginecologica* 56, 2004, 247-257.
- Leunens, L., Celestin-Westreich, S., Bonduelle, M., Liebaers, I., Ponjaert-Kristoffersen, I. «Cognitive and motor development of 8-year-old children born after ICSI compared to spontaneously conceived children». *Human Reproduction* 21, 2006, 2922-2929.
- Leunens, L., Celestin-Westreich, S., Bonduelle, M., Liebaers, I., Ponjaert-Kristoffersen, I. «Follow-up of cognitive and motor development of 10-year-old singleton children born after ICSI compared with spontaneously conceived children». *Human Reproduction* 23, 2008, 105-111
- Li, S.J., Ford, N., Meister, K., Bodurtha, J. «Increased risk of birth defects among children from multiple births». *Birth Defects Research. Part A. Clinical and Molecular Teratology* 67, 2003, 879-885.
- Li, T., Vu, T.H., Ulaner, G.A., Littman, E., Ling, J.Q., Chen, H.L., et al. «IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch». *Molecular Human Reproduction* 11, 2005, 631-640.
- Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A. «Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy». *Nature* 429, 2004, 457-463.
- Lie, R.T., Lyngstadaas, A., Orstavik, K.H., Bakketeig, L.S., Jacobsen, G., Tanbo, T. «Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis». *International Journal of Epidemiology* 34, 2005, 696-701.
- Lidegaard, Ø., Pinborg, A., Andersen, A.N. «Imprinting disorders after assisted reproductive technologies». *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 18, 2006, 293-296.
- Lidegaard, Ø., Pinborg, A., Andersen, A.N. «Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study» *Human Reproduction* 20, 2005, 950-954.
- Liebaers, I., Desmyttere, S., Verpoest W., De Rycke, M., Staessen, M.C., Sermon K., Devroey, P., Haentjens, P., Bonduelle, M. «Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis». *Human Reproduction* 25, 2010, 275-282.
- Lim, D., Bowdin, S.C., «Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies». *Human Reproduction* 24, 2009, 741-747.

- Lipshultz, L.I., Lamb, D.J. «Risk of transmission of genetic diseases by assisted reproduction». *Nature Clinical Practice Urology* 4, 2007, 460-461.
- Ludwig, M., Katalinic, A., Grog, S, Sutcliffe, A., Varon, R., Horsthemke, J. «Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples». *Journal of Medical Genetics* 42, 2005, 289-291.
- Ludwig, A. K, Sutcliffe, A.G., Diedrich, K., Ludwig, M. «Post-neonatal health and development of children born after assisted reproduction: a systematic review of controlled studies». *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 127, 2006, 3-25.
- Ludwig, M. «Are adverse outcomes associated with assisted reproduction related to the technology or couples' subfertility?» *Nature Clinical Practice Urology* 6, 2009, 8-16.
- Ludwig, A.K., Katalinic, A., Thyen, U., Sutcliffe, A.G., Diedrich, K., Ludwig, M. «Physical health at 5.5 years of age of term-born singletons after intracytoplasmic sperm injection: results of a prospective, controlled, single-blinded study». *Fertility and Sterility* 91, 2009, 115-124.
- Lucifero, D., Chaillet, J.R., Trasler, J.M. «Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology». *Human Reproduction Update* 10(1), 2004, 3-18.
- Mackay, A.P., Berg, C.J., King, J.C., Duran, C., Chang, J. «Pregnancy-related mortality among women with multifetal pregnancies». *Obstetrics and Gynecology* 107, 2006, 563-568.
- McGovern, PG, Llorens AJ, Skurnick JH, Weiss, G, Goldsmith, LT. «Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies resulting from in vitro fertilization-embryo transfer or gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis». *Fertility and Sterility* 82, 2004, 1514-1520.
- Maher, E.R., Reik, W. «Beckwith-Wiedemann syndrome imprinting in clusters revisited». *Journal of Clinical Investigation* 105, 2000, 247-252.
- Maher, E.R., Brueton, L.A., Bowdin, S.C., Luharia, A., Cooper, W., Cole, T.R., Macdonald, F., Sampson, J.R., Barratt, C.L., Reik, W., Hawkins, M.M. «Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART)». *Journal of Medical Genetics* 40, 2003, 62-64.
- Maher, E.R., Afnan, M., Barratt, C.L., «Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Epigenetics, imprinting, ART and icebergs?» *Human Reproduction* 18, 2003, 2508-2511.
- Mandavilli, A. «As IVF becomes more common, some concerns remain». *Nature Medicine* 14, 2008, 1171.
- Mangelschots, K.J, et al. «The obstetrical and neonatal outcome of babies born after single-embryo transfer in IVF/ICSI compares favourably to spontaneously conceived babies». *Human Reproduction* 21, 2006, 1041-1046.
- Mann, M.R., Lee, S.S., Doherty, A.S., Verona, R.I., Nolen, L.D., Schultz, R.M., et al. «Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation

- development in culture». *Development* 131, 2004, 3727–3735.
- Manipalviratn, S., DeCherney, A., Segars, J. «Imprinting disorders and assisted reproductive technology» *Fertility and Sterility* 91, 2009, 305–315.
- Manning, M., Lissens, W., Bonduelle, M., Camus, M. *et al.* «Study of DNA-methylation patterns at chromosome 15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects». *Molecular Human Reproduction* 6, 2000, 1049-1053.
- Marjoribanks, J., Farquhar, C., Marshall, C. «Systematic review of the health risks to the mother, child and family associated with the use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI)». *Report to the Ministry of Health from the New Zealand Guidelines Group undertaken by the Cochrane Menstrual Disorders and Subfertility*, New Zealand, 90 pp., 2005.
- Marino, J.L., Moore, V.M., Rumbold, A.R., Davies, M.J. «Fertility treatments and the young women who use them: an Australian cohort study». *Human Reproduction* 26, 2011, 473-479.
- Martin, J.A., Hamilton, B.E., Sutton, P.D., Ventura, S.J., Menacker, F., Kirmeyer, S., *et al.* «Births: final data for 2006». *National Vital Statistics Reports* 57, 2009, 1–101.
- Marques, C.J., Francisco, T., Sousa, S., Carvalho, F., Barros, A., Sousa, M. «Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 585–594.
- Mastroiacovo, P., Castilla, E.E., Arpino, C, Botting, B., Cocchi, G., Goujard, J., Mau Kai, C., *et al.* «Reduced serum testosterone levels in infant boys conceived by intracytoplasmic sperm injection». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92, 2007, 2598–2603.
- Mahsoudi, B., Li, A., O'Neill, C. «Assessment of the long-term and transgenerational consequences of perturbing preimplantation embryo development in mice». *Biology of Reproduction* 77, 2007, 889–896.
- Matzuk, M.M., Lamb, D.J. «Genetic dissection of mammalian fertility pathways». *Nature Cell Biology* 4 (Suppl), 2002, S41–S49.
- Mau, K.C., Jul, A., Main, K.M., Loft, A. «Children conceived after intracytoplasmic sperm injection (ICSI): is there a role for the paediatrician?» *Acta Paediatrica* 93, 2004, 1238-1244.
- Mau, K.C., Main, K.M., Andersen, A.N., Loft, A., Skakkebaek, N.E., Juul, A. «Reduced serum testosterone levels in infant boys conceived by intraplasmatic sperm injection». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92, 2007, 2598–2603.
- McDonald, S., Murphy, K., Beyene, J., Ohlsson, A. «Perinatal outcomes of in vitro fertilization twins: a systematic review and meta-analyses». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193, 2005, 141–152.
- McDonald, S.D., Murphy, K., Beyene, J., Ohlsson, A. «Perinatal outcomes of singleton pregnancies achieved by in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis». *Journal of Obstetrics and Gynecology Canada* 27 (5), 2005, 49–59.

- McDonald, S.D., Han, Z., Mulla, S., Murphy, K.E., Beyene, J., Ohlsson, A. «Preterm birth and low birth weight among in vitro fertilization singletons: a systematic review and meta-analysis». *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 148, 2010, 105–113.
- McElrath, T.F., Wise, P.H. «Fertility therapy and the risk of very low birth weight». *Obstetrics and Gynecology* 90, 1997, 600–605.
- McGovern, P.G., Llorens, A.J., Skurnick, J.H., Weiss, G., Goldsmith, L.T. «Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies resulting from in vitro fertilization– embryo transfer or gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis». *Fertility and Sterility* 82, 2004, 1514–1520.
- Merlob, P., Sapir, O., Sulkes, J., Fisch, B. «The prevalence of major congenital malformations during two periods of time, 1986–1994 and 1995–2002 in newborns conceived by assisted reproduction technology». *European Journal of Medical Genetics* 48, 2005, 5–11.
- Michelmann, H.W., Nayudu, P. «Cryopreservation of human embryos». *Cell Tissue Bank* 7, 2006, 135–141.
- Middelburg KJ, Heineman MJ, Bos AF, Hadders-Algra M. «Neuromotor, cognitive, language and behavioural outcome in children born following IVF or ICSI: a systematic review». *Human Reproduction Update* 14, 2008, 219–231.
- Mihci, E., Guney, K., Velipasaoglu, S. «DOOR (deafness, onychodystrophy, osteodystrophy, mental retardation) syndrome in one of the twins after conception with intracytoplasmic sperm injection». *American Journal of Medical Genetics A* 146, 2008, 1483–1485.
- Milki, A.A. «Rate of aneuploidy in miscarriages following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility* 81(5), 2004, 1270–1272.
- Midrio, P., Nogare, C.D., Di Gianantonio, E., Clementi, M. «Are congenital anorectal malformations more frequent in newborns conceived with assisted reproductive techniques?» *Reproductive Toxicology* 22, 2006, 576–577.
- Miranda, T.B., Jones, P.A. «DNA methylation: the nuts and bolts of repression». *Journal of Cell Physiology* 213, 2007, 384–390.
- Moise, J, Laor, A., Armon, Y., Gur, I., Gale, R. «The outcome of twin pregnancies after IVF». *Human Reproduction*. 13(6), 1991, 702–1705.
- Moll, A.C., Imhof, S.M., Cruysberg, J.R.M., Schouten-van Meeteren, A.Y.N. et al. «Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation». *Lancet* 361, 2003, 309–310.
- Monti, F., Agostini, F., Fagandini, P., La Sala, G.B., Blickstein, I. «Depressive symptoms during late pregnancy and early parenthood following assisted reproductive technology». *Fertility and Sterility* 91, 2009, 851–857.
- Nekkebroeck, J., Bonduelle, M., Desmyttere, S., Van den Broeck, W., Ponjaert-Kristoffersen, I. «Mental and psychomotor development of 2-year-old children born after

- preimplantation genetic diagnosis/screening». *Human Reproduction* 23 (7), 2008, 1560-1566.
- Neri, Q.V., Tanaka, N., Wang, A., Katagiri, Y., Takeuchi, T., Rosenwaks, Z., et al. «Intracytoplasmic sperm injection. Accomplishments and qualms». *Minerva Ginecologica* 56 (3), 2004, 189-196.
- Nicopoulos, J.D.M., Gilling-Smith, C., Almeida, P.A., Norman-Taylor, J., Grace, I., Ramsay, J.W.A. «Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis». *Fertility and Sterility* 82 (3), 2004, 691-701.
- Niemitz, E.L., Feinberg, A.P. «Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation». *American Journal of Human Genetics* 74, 2004, 599-609.
- Nygren, K.G., Finnstrom, O., Kalle'n, B., Olausson, P.O. «Population-based Swedish studies of outcomes after in vitro fertilization». *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 86, 2007, 774-782.
- Obata, Y., Hiura, H. «Epigenetically immature oocytes lead to loss of imprinting during embryogenesis» *Journal of Reproduction and Development* 57, 2011, 327-334.
- Ochsenkühn, R., Strowitzki, T., Gurtner, M., et al. «Pregnancy complication, obstetric risks, and neonatal outcome in singleton and twin pregnancies after GIFT and IVF». *Archives of Gynecology and Obstetrics* 268, 2003, 256-261.
- Odom, L.N., Segars, J. «Imprinting disorders and assisted reproductive technology». *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 17, 2010, 517-522.
- Olivennes, F., Fanchin, R., Ledee, N., Righini, C., Kadoch, I.J., Fryman, R. «Perinatal outcome and developmental studies on children born after IVF». *Human Reproduction Update* 8, 2002, 117-128.
- Olivennes, F., Ramogidas, S., Golombok, S. «Children's cognitive development and family functioning in a large population of IVF/ICSI twins». *Fertility and Sterility* 82 (Supplement 2), 2004, S37-S37.
- Olivennes, F. «Do children born after assisted reproductive technology have a higher incidence of birth defects?» *Fertility and Sterility* 84, 2005, 1325-1326.
- Olson, C.K., Keppler-Noreuil, K.M., Romitti, P.A., Budelier, W.T., Ryan, G., Sparks, A.E., Van Voorhis, B.J. «In vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects». *Fertility and Sterility* 84, 2005, 1308-1315.
- Ørstavik, K.H., Eiklid, K., van der Hagen, C.B., Spetalen, S. et al. «Another case of imprinting defect in a girl with Angelman Syndrome who was conceived by intracytoplasmic sperm injection». *American Journal of Human Genetics* 72, 2003, 218-219.
- Owen, C.M., Segars, J.H. Jr. «Imprinting disorders and assisted reproductive technology». *Seminars in Reproductive Medicine* 27, 2009, 417- 428.
- Pacheco, S.E., Houseman, E.A., Christensen, B.C., Marsit, C.J., Kelsey, K.T., Sigman, M., Boekelheide, K. «Integrative DNA Methylation and Gene Expression Analyses Identify DNA Packaging and Epigenetic Regulatory Genes Associated with Low Motility Sperm». *PLoS ONE* 6, 2011, e20280.

- Papanikolaou, E.G., Pozzobon, C., Kolibianakis, E.M., *et al.* «Incidence and prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing gonadotroin-releasing hormone antagonist in vitro fertilization cycles». *Fertility and Sterility* 85, 2006, 112–120.
- Paulus, W.E., Strehler, E., Mack, M., Sterzik, K. «Does the development of children differ between IVF and ICSI treatment?» *Fertility and Sterility* 8 (Supplement 2), 2004, 51-52.
- Patrizio, P., Asch, R.H., Handelin, B., Silber, S.J. «Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations». *Human Reproduction* 8, 1993, 215-220.
- Pelkonen, S., Koivunen, R., Gissler, M., Nuojua-Huttunen, S., Suikkari, A.-M. Hyden-Granskog, C., Martikainen, H., Tiitinen, A., Hartikainen, A.-L. «Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995–2006». *Human Reproduction* 25, 2010, 914–923.
- Pellicer, A., Bravo, M.C., Madero, R., Salas, S., Quero, J., Cabañas, F. «Early Systemic Hypotension and Vasopressor Support in Low Birth Weight Infants: Impact on Neurodevelopment». *Pediatrics* 123, 2009, 1369-1376.
- Pinborg, A., Loft, A., Rasmussen, S., Nyboe Andersen, A. «Hospital care utilization of IVF/ICSI twins followed until 2–7 years of age: a controlled Danish national cohort study». *Human Reproduction* 19, 2004, 2529-2536.
- Pinborg, A., Lidegaard, O., Freiesleben, N.C., Andersen, A.N. «Vanishing twins: a predictor of small-for-gestational age in IVF singletons». *Human Reproduction* 22, 2007, 2707–2714.
- Pinborg, A., Loft, A., Aaris Henningsen, A.-K., Rasmussen, S., Nyboe Andersen, A. «Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: The Danish National Cohort Study 1995–2006». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 1320–1327.
- Ponjaert-Kristoffersen, I., Tjus, T., Nekkebroeck, J., Squires, J., Verte, D., Heimann, M. *et al.* «Psychological follow-up study of 5-year-old ICSI children». *Human Reproduction* 19 (12), 2004, 2791-2797.
- Ponjaert-Kristoffersen, I., Bonduelle, M., Barnes, J., Nekkebroeck, J., Loft, A., Wennerholm, U.B., *et al.* «International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, *in vitro* fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments». *Pediatrics* 115, 2005, e283–e289.
- Poikkeus, P., Gissler, M., Unkila-Kallio, L., Hyden-Granskog, C., Tiitinen, A. «Obstetric and neonatal outcome after single embryo transfer». *Human Reproduction* 22, 2007, 1073–1079.
- Powell, K. «Seeds of doubt». *Nature* 422, 2003, 656-658.
- Raimondi, S., Pedotti, P., Taioli, E. «Meta-analysis of cancer incidence in children born after assisted reproductive technologies». *British Journal of Cancer* 93, 2005, 1053–1056.
- Raziel, A., Friedler, S., Schachter, M. *et al.* «Increased early pregnancy loss in IVF patients with severe ovarian

- hyperstimulation syndrome». *Human Reproduction* 17, 2002, 107–110.
- Reddy, U.M. *et al.* «Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development Workshop». *Obstetrics and Gynecology* 109, 2007, 967–977.
- Reefhuis, J., Honein, M.A., Schieve, L.A., Correa, A., Hobbs, C.A., Rasmussen, S.A. and the National Birth Defects Prevention. «Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States». *Human Reproduction* 24 (2), 2005, 360-366.
- Reefhuis, J., Honein, M.A., Schieve, L.A., Rasmussen, S.A. «Use of clomiphene citrate and birth defects, National birth defects prevention study, 1997-2005». *Human Reproduction* 26, 2011, 451-457.
- Reijo, R., *et al.* «Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome». *Lancet* 347, 1996, 1290–1293.
- Reik, W., Romer, I., Barton, S.C., Surani, M.A., Howlett, S.K. and Klose, J. «Adult phenotype in the mouse can be affected by epigenetic events in the early embryo». *Development*, 119, 1993, 933-942.
- Reik, W. «Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth». *Reviews of Reproduction* 1, 1996, 73-77.
- Reik, W., Walter, J. «Genomic imprinting: parental influence on the genome». *Nature Review Genetics* 2, 2001, 21-32.
- Rinaudo, P.F., Giritharan, G., Talbi, S., Dobson, A.T., Schultz, R.M. «Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos». *Fertility and Sterility* 86, 2006, 1252–1265.
- Reynolds, M.A., Schieve, L.A., Jeng, G., Peterson, H.B., Wilcox, L.S. «Risk of multiple birth associated with in vitro fertilization using donor eggs». *American Journal of Epidemiology* 154, 2001, 1043–1050.
- Rexhaj, E., Giacobino, A., Nicod, P., Germond, M., Sartori, C., Sherrer, U. «Mice generated by assisted reproductive technologies, a model organism for the study of epigenetic mechanisms of vascular dysfunction in vivo». *Circulation* 122, 2010, A19117.
- Rexhaj, E., Bloch, J., Jayet, P.Y., Rimoldi, S.F., Dessen, P., Mathieu, C., Tolsa, J.F., Nicod, P., Scherrer, U., Sartori, C. «Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: role of epigenetic mechanisms». *American Journal of Physiology. Heart Circulation Physiology* 301, 2011, H247–H252.
- Rivera, R.M., Stein, P., Weaver, J.R., Mager, J., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S. «Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development». *Human Molecular Genetics* 17, 2008, 1–14.
- Rimm, A.A., Katayama, A.C., Diaz, M., Katayama, K.P. «A Meta-Analysis of Controlled Studies Comparing Major Malformation Rates in IVF and ICSI Infants with Naturally Conceived Children». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21, 2004, 437-443.
- Rizk, B., Doyle, P. Tan, S.L., Rainsbury, P., Betts, J., Brinsden, P., Edwards, R.

- «Perinatal outcome and congenital malformations in in-vitro fertilization babies from the Bourn-Hallam group». *Human Reproduction* 6, 1991, 1259-1264.
- Rodrigo, L., Peinado, V., Mateu, E., Remon J., Pellicer, A., Simon, C., Gil-Salom, M., Rubio, C. «Testicular sperm from patients with obstructive and non-obstructive azoospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 1380–1386.
- Romundstad, L.B. *et al.* «Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study». *Lancet* 372, 2008, 737–743.
- Rossignol, S., Steunou, V., Chalas, C., Kerjean, A., Rigolet, M., Viegas- Pequignot, E., Jouannet, P., Le Bouc, Y., Gicquel, C. «The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15region». *Journal of Medical Genetics* 43, 2006, 902–907.
- Sagot, P., Bechoua, S., Ferdynus, C., Facy, A., Flamm, X., Gouyon, J.B., Jimenez, C. «Similarly increased congenital anomaly rates after intrauterine insemination and IVF technologies: a retrospective cohort study». *Human Reproduction* 27, 2012, 902–909.
- Sakka, S.D., Malamitsi-Puchner, A., Loutradis, D., Chrousos, G.P., Kanaka-Gantenbein, C. «Euthyroid hyperthyrotropinemia in children born after in vitro fertilization». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94, 2009, 1338–1341.
- Sakka, S.D., Loutradis, D., Kanaka-Gantenbein, C., Margeli, A., Papastamataki, M., Papassotiriou, I., *et al.* «Absence of insulin resistance and low-grade inflammation despite early metabolic syndrome manifestations in children born after in vitro fertilization». *Fertility and Sterility* 94, 2010, 1693–1699.
- Sato, A., Otsu, E., Negishi, H., Utsunomiya, T., Arima, T. «Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes». *Human Reproduction* 22, 2007, 26–35.
- Saygan-Karamursel, B., Tekşam, O., Aksu, T., Yurdakök, M., Onderoglu, L. «Perinatal outcomes of spontaneous twins compared with twins conceived throughintracytoplasmic sperm injection». *Journal of Perinatal Medicine* 34, 2006, 132–138.
- Scherrer, U., Rimoldi, S.F. Rexhaj, E. Stuber, T., Duplain, H., Garcin, S.; de Marchi, S.F., Nicod, P., Germond, M., Allemann, Y., Sartori, C. «Systemic and Pulmonary Vascular Dysfunction in Children Conceived by Assisted Reproductive Technologies». *Circulation* 125, 2012, 1890-1896.
- Schieve, L.A., Meikle, S.F., Ferre, C., Peterson, H.B., Jeng, G., Wilcox, L.S. «Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology». *New England Journal of Medicine* 346, 2002, 731–737.
- Schieve, L.A., Rasmussen, S.A., Buck, G.M., Schendel, D.E., Reynolds, M.A., Wright, V.C. «Are children born after assisted reproductive technology

- at increased risk for adverse health outcomes?» *Obstetrics and Gynecology* 103, 2004, 1154–1163.
- Schieve, L.A., Rasmussen, S.A., Reefhuis, J. «Risk of birth defects among children conceived with assisted reproductive technology: providing an epidemiologic context to the data». *Fertility and Sterility* 84, 2005, 1320–1324.
- Schieve, L.A., Cohen, B., Nannini, A., Ferre, C., Reynolds, M.A., Zhang, Z., Jeng, G., Macaluso, M., Wright, V.C.; Massachusetts Consortium for Assisted Reproductive Technology Epidemiologic Research (MCARTER). «Study of Maternal and Perinatal Outcomes Associated with Assisted Reproductive Technology in Massachusetts». *Maternal and Child Health Journal* 11, 2007, 517–525.
- Schieve, L., Devine, O., Boyle, C.A., Petrini, J.R., Warner, L. «Estimation of the contribution of non-assisted reproductive technology ovulations stimulation fertility treatments to US singleton and multiple births». *American Journal of Epidemiology* 170(11), 2009, 1396–1407.
- Shih, W., Rushford, D.D., Bourne, H., Garrett, C., McBain, J.C., Healy, D.L., Baker, H.W. «Factors affecting low birth weight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection». *Human Reproduction* 23, 2008, 1644–1653.
- Schultz, R.M., Williams, C.J. «The science of ART». *Science*, 296, 2002, 2188–2190.
- Scotland, G.S., McLernon, D., Kurinczuck, J.J., McNamee, P., Harrild, K., Lyall, H., Rajkhowa, M., Hamilton, M., Bhattacharya, S. «Minimising twins in *in vitro* fertilisation: a modelling study assessing the costs, consequences and cost-utility of elective single versus double embryo transfer over a 20-year time horizon». *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 118(19), 2011, 1073–1083.
- Sebastiani, G., Pertierra Cortada, A., Vidal Sordé, E., Figueras Aloy, J., Balasch Cortina, J. «Factors associated with assisted reproduction technologies and neonatal outcomes». *Anales de Pediatría (Barcelona)* 70, 2009, 323–332.
- Shevell, T., Malone, F.D., Vidaver, J., Porter, T.F., Luthy, D.A., Comstock, C.H., *et al*, for the FASTER Research Consortium. «Assisted reproductive technology and pregnancy outcome». *Obstetrics and Gynecology* 106, 2005, 1039–1045.
- Shih, W., Rushford, D.D., Bourne, H., Garrett, C., McBain, J.C., Healy, D.L., Baker, H.W. «Factors affecting low birth weight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection». *Human Reproduction* 23, 2008, 1644–1653.
- Shozu, M., Akimoto, K., Tanaka, J., Sonoda, Y., Inoue, M., Michikura, Y. «Antenatal detection of Meckel–Gruber syndrome in only one dizygotic twin following *in vitro* fertilization and embryo transfer». *Gynecologic and Obstetric Investigation* 43, 1997, 42–44.

- Silver, R.I., Rodriguez, R., Chang, T.S.K., Gearhart, J.P. «In vitro fertilization is associated with an increased risk of hypospadias». *Journal of Urology* 161, 1999, 1954–1957.
- Skinner, M.K., Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C. «Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology». *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21, 2010, 214–222.
- Smilnich, N.J., Day, C.D., Fitzpatrick, G.V., Caldwell, G.M., Lossie, A.C., Cooper, P.R., Smallwood, A.C., Joyce, J.A., Schoeld, P.N., Reik, W. *et al.* «A maternally methylated CpG island in KCNQ1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome». *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 96, 1999, 8064–8069.
- Soderstrom-Anttila, V. *et al.* «Obstetric and perinatal outcome and preliminary results of development of children born after *in vitro* maturation of oocytes». *Human Reproduction* 21, 2006, 1508–1513.
- Steel, A. J., Sutcliffe, A. «Long-term health implications for children conceived by IVF/ICSI». *Human Fertility* 12, 2009, 21–27.
- Stein, P., Weaver, J.R., Mager, J., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S. «Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development». *Human Molecular Genetics* 17, 2008, 1–14.
- Stouder, C., Deutsch, S., Paoloni-Giacobino, A. «Superovulation in mice alters the methylation pattern of imprinted genes in the sperm of the offspring». *Reproductive Toxicology* 28, 2009, 536–541.
- Strömberg, B., Dahlquist, G., Ericson, A., Finnström, O., Köster, M., Stjernqvist, K. «Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population based study». *Lancet* 359, 2002, 461–465.
- Steinkampf, M.P., Grifo, J. «Major birth defects after assisted reproduction». *New England Journal of Medicine* 347, 2002, 1449–1451.
- Sun, Y., Vestergaard, M., Christensen, J., Zhu, J.L., Bech, B.H., Olsen, J. «Epilepsy and febrile seizures in children of treated and untreated subfertile couples». *Human Reproduction* 22, 2007, 215–220.
- Sunderam, S., Chang, J., Flowers, L., Kulkarni, A., Sentelle, G., Jeng, G., Macaluso, M. «Assisted Reproductive Technology Surveillance--United States, 2006». *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries* 58(SS05), 2009, 1–25.
- Sutcliffe, A.G., D'Souza, S.W., Cadman, J., Richards, B., McKinlay, I.A., Lieberman, B. «Minor congenital anomalies, major congenital malformations and development in children conceived from cryopreserved embryos». *Human Reproduction* 10, 1995, 3332–3337.
- Sutcliffe, A.G., Peters, C.J., Bowdin, S., Temple, K., Reardon, W., Wilson, L., *et al.* «Assisted reproductive therapies and imprinting disorders—a preliminary British survey». *Human Reproduction* 21, 2006, 1009–1011.

- Sutcliffe, A.G., Ludwig, M. «Outcome of assisted reproduction». *Lancet* 370, 2007, 351–359.
- Tan, S.L., Doyle, P., Campbell, S. *et al.* «Obstetric outcome of in vitro fertilization pregnancies compared with normally conceived pregnancies». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 167, 1992, 778–784.
- Tang, Y., Ma, C.X., Cui, W., Chang, V., Ariet, M., Morse, S.B., Resnick, M.B., Roth, J. «The risk of birth defects in multiple births: a population-based study». *Maternal and Child Health Journal* 10, 2006, 75–81.
- Sato, A., Otsu, E., Negishi, H., Utsunomiya, T., Arima, T. «Aberration DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes». *Human Reproduction* 22, 2007, 26–35.
- Thompson, J.G., Kind, K.L., Roberts, C.T., Robertson, S.A., Robinson, J.S. «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, 2002, 2783–2786.
- Thomson, F., Shanbhag, S., Templeton, A. *et al.* «Obstetric outcome in women with subfertility». *BJOG* 112, 2005, 632–637.
- Thompson, J.R., Williams, C.J. «Genomic imprinting and assisted reproductive technology: connections and potential risks». *Seminars in Reproductive Medicine* 23, 2005, 285–295.
- Thurin, A., Hausken, J., Hillensjo, T., Jablonowska, B., Pinborg, A., Strandell, A., *et al.* «Elective single embryo transfer versus double embryo transfer in in vitro fertilization». *New England Journal of Medicine*. 351, 2004, 2392–2402.
- Tiepolo, L., Zuffardi, O. «Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm». *Human Genetics* 34, 1976, 119–124.
- Tierling, S., Souren, N.Y., Gries, J., Loporito, C., Groth, M., Lutsik, P., *et al.* «Assisted reproductive technologies do not enhance the variability of DNA methylation imprints in human» *Journal of Medical Genetics* 47, 2010, 371–648.
- Tosti, E., Fortunato, A., Settimi, A. «The impact of in vitro fertilization on the health of the mother and the offspring». *Current Women's Health Review* 2, 2006, 239–247.
- Turan, N., Katari, S., Gerson, L.F., Chalian, R., Foster, M.W., Gaughan, J.P., *et al.* «Inter- and intra-individual variation in allele-specific DNA methylation and gene expression in children conceived using assisted reproductive technology». *PLoS Genetics* 6, 2010, e100103345.
- Vahratian, A., Schieve, L.A., Reynolds, M.A., Jeng, G. «Live-birth rates and multiple-birth risk of assisted reproductive technology pregnancies conceived using thawed embryos, USA, 1999–2000». *Human Reproduction* 18 (7), 2002, 1442–1448.
- Van der Auwera, I., D'Hooghe, T. «Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development».

- Human Reproduction* 16 (6), 2001, 1237-1243.
- Van Landuyt, L., Verheyen, G., Tournaire, H., Camus, M., Devroey, P., Van Steirteghem, A. «New Belgian embryo transfer policy leads to sharp decrease in multiple pregnancy rate». *Reproductive Biomedicine Online* 13, 2006, 765-771.
- Verlaenen, H., Cammu, H., Derde, M.P., Amy, J. «Singleton pregnancy after in vitro fertilization: expectations and outcome» *Obstetrics and Gynecology* 86, 1995, 906-910.
- Wang, J.X., Norman, R.J., Wilcox, A.J. «Incidence of spontaneous abortion among pregnancies produced by assisted reproductive technology». *Human Reproduction* 19, 2004, 272-277.
- Wang, Z., Xu, L., He, F. «Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2». *Fertility and Sterility* 93, 2010, 2729-2733.
- Wagenaar, K., Huisman, J., Cohen-Kettenis, P.T., Delemarre-van de Waal, H.A. «An overview of studies on early development, cognition, and psychosocial wellbeing in children born after in vitro fertilization». *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* 29, 2008, 219-230.
- Wadhwa, P.D., Buss, C., Entringer, S., Swanson, JM. «Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms». *Seminars in Reproductive Medicine* 27, 2009, 358-368.
- Watkins, A.J., Fleming, T.P. «Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter». *Journal of Anatomy* 215, 2009, 52-59.
- Wen, S.W., Leader, A., White, R.R., Leveille, M.C., Wilkie, V., Zhou, J., Walker, M.C. «A comprehensive assessment of outcomes in pregnancies conceived by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection» *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 150, 2010, 160-165.
- Wennerholm, U.B., Bergh, C., Hamberger, L., Lundin, K., Nilsson, L., Wikland, M., Källén, B. «Incidence of congenital malformations in children born after ICSI». *Human Reproduction* 15, 2000, 944-948.
- Wennerholm, U.B., Söderström-Anttila, V., Bergh, C., *et al.* «Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data». *Human Reproduction* 24, 2009, 2158-2172.
- Westergaard, H.B., Johansen, A.M., Erb, K., Andersen, A.N. «Danish National IVF Registry 1994 and 1995: a controlled study of births, malformations and cytogenetic findings». *Human Reproduction* 14, 1999, 1896-1902.
- Wikstrand, M.H., Niklasson, A., Stromland, K., Hellstrom, A. «Abnormal vessel morphology in boys born after intracytoplasmic sperm injection». *Acta Paediatrica* 97, 2008, 1512-1517.
- Wieczorek, D., Ludwig, M., Boehringer, S., Jongbloet, P.H., Gillessen-Kaesbach, G., Horsthemke, B. «Reproduction

- abnormalities and twin pregnancies in parents of sporadic patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum/Goldenhar syndrome». *Human Genetics* 21, 2007, 369–376.
- Winston, R.M., Hardy, K. «Are we ignoring potential dangers of in vitro fertilization and related treatments?» *Nature Cell Biology and Nature Medicine*, 2002, 514-18.
- Wood, H.M., Babineau, D., Gearhart, J.P. «In vitro fertilization and the cloacal/bladder exstrophyeepispadias complex: A continuing association». *Journal of Pediatric Urology* 3, 2007, 305-310.
- Wright, V., Chang, J., Jeng, G., Macaluso, M. «Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2005». *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries* 57, 2008, 1–23.
- Yang, Q., Wen, S.W., Leader, A., Chen, X.K., Lipson, J., Walker, M. «Paternal age and birth defects: how strong is the association?» *Human Reproduction* 22, 2007, 696-701.
- Yoon, G., Beischel, L.S., Johnson, J.P., Jones, M.C. «Dizygotic twin pregnancy conceived with assisted reproductive technology associated with chromosomal anomaly, imprinting disorder, and monozygotic twinning» *The Journal of Pediatrics* 146, 2005, 565-567.
- Young, L.E., Fernandes, K., McEvoy, T.G., Butterwith, S.C., Gutierrez, C.G., Carolan, C., Broadbent, P.J., Robinson, J.J., Wilmut, I. Sinclair, K.D. «Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture». *Nature Genetics* 27, 2001, 153-154.
- Zadori J, Kozinszky A, Porvos H, Katona M, Kaali SG, P. *et al.* «The incidence of major birth defects following in vitro fertilization». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 20, 2003, 131–132.
- Zaitseva, I, Zaitseva, S., Bader, A.N., Kri-vokharchenko, M., A. «Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro». *Molecular Reproduction and Development* 74, 2007, 1255–1261.
- Zechner, U., Pliushch, G., Schneider, E., El Hajj, N., Tresch, A., Shufaro, Y., *et al.* «Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception». *Molecular Human Reproduction* 16, 2010, 704–713.
- Zhang, Y., Zhang, Y.L., Feng, C., Wu, Y.T., Liu, A.X., Sheng, J.Z., *et al.* «Comparative proteomic analysis of human placenta derived from assisted reproductive technology». *Proteomics* 8, 2008, 4344–4346.
- Zhu, J.L., Basso, O., Obel, C., Bille, C., Olsen, J. «Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort». *BMJ* 333, 2006, 679.
- Zhu, J. L., Basso, O., Obel, C., Bille, C., Olsen, J., Hvidtjørnb, D. «Infertility, infertility treatment and psychomotor development: the Danish National Birth Cohort». *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 23, 2009, 98–106.
- Zhu J, Hvidtjrn D, Basso O, Obel C, Thorsen P, Uldall P, *et al.* «Parental infertility and cerebral palsy in children». *Human Reproduction* 25 (12), 2010, 3142-3145.

