

Objeción de ciencia a Técnicas de Reproducción Asistida

Natalia López Moratalla

Fecha: mayo 2009

Arvo.net, 20-01.2010

1. De una solución provisional a la esterilidad a programación de la Humanidad

En julio de 2008, treinta aniversario del nacimiento de Louise Brown, la primera niña nacida por fecundación in vitro (FIV), la revista Nature dedica un número especial a las Técnicas de Reproducción Asistida (ART). Helen Pearson¹ entrevista a diversos pioneros del desarrollo de esta tecnología (Alan Trounson, Miodrag Stojkovic, Scott Gelfand, etc.) acerca del impacto esperable en los próximos treinta años. Las respuestas sitúan el proyecto en una clara línea de dominio tecnológico de la transmisión de la vida, alejada cada vez más de la relación natural paterno-filial. Se pretende:

a) Eliminar el límite natural del periodo de fertilidad femenina, extendiéndolo en el tiempo, sobre la base de reprogramar células somáticas a oocitos, o de crioconservar en bancos los gametos de las jóvenes, de forma que puedan elegir cuándo ser madre. b) Alguno afirma que se podrá conseguir la clonación reproductiva que tiene como "único" problema la gran cantidad de los óvulos que, hoy por hoy, serían imprescindibles para intentar lograrlo; el problema se solucionará produciendo los óvulos. c) Incluso se profetiza que se adelantará el tiempo en que el feto es viable fuera de la mujer que lo gesta (actualmente a las 22 semanas) lo que permitirá que a las 12 semanas se pudiera completar el desarrollo fuera de la madre de alquiler y liberar así a la mujer de la gestación. d) Otros plantean que el diagnóstico genético previo a la implantación (PGD), que se usa por ahora para identificar alteraciones que generan enfermedades monogénicas y identificar predisposición a otras enfermedades, se deberá ampliar el diagnóstico para generar niños de diseño. La cuestión, señalan, es que no se sabe muy bien cuales serán las preferencias de los que encarguen los embriones por lo que no se dedica, de momento, mucho esfuerzo a escrutar los embriones in vitro.

Varios de los entrevistados, no todos, señalan que la aplicación de las ART, de momento resulta cara y molesta; se debería emplear fármacos de bajo coste para la estimulación ovárica y mejorar este proceso para evitar las complicaciones que conllevan en algunas mujeres, aunque con ello se generen menos embriones. Algunos muestran dudas sobre la seguridad de los procedimientos por el hecho de que cada vez es más claro el efecto negativo sobre la salud de los niños. De algunas anomalías como el Síndrome Beckwith Wiedemann hay evidencia de que es más frecuente en niños producidos por FIV que en los engendrados de forma natural. Como la causa no está clara no les preocupa demasiado y no se plantean analizar con firmeza la alarma existente ya entre pediatras y reflexionar.

El planteamiento ha sobrepasado desde el inicio la justificación inicial con carácter provisional de paliar la esterilidad, sin curarla, mientras no se dispusiera de terapias adecuadas. Se ha convertido en una poder sobre la transmisión de la vida humana del tipo que Aldous Huxley describió, en «Un mundo feliz» en el que los hombres se confeccionan en una fábrica en la que se determinaban a «amar lo que uno tiene que hacer»; así los programadores conseguían así que lo que «el hombre - el director de la granja de hombres que decidía que tenían que hacer -ha unido, la naturaleza no pueda separarlo».

Por otra parte, la investigación con los embriones se lleva a cabo directamente sobre ellos, cambiando las condiciones de las técnicas sin experimentación previas en

animales, y con carácter retroactivo. Esta manipulación no busca posibles beneficios del embrión mismo, sino a la eficacia en términos de embarazo logrado.

En la cultura contemporánea la FIV se presenta como una conquista que permite saltarse las leyes y los límites naturales de la transmisión de la vida, superando de este modo el conflicto de dos derechos. El derecho del hijo a su origen en el engendrar de sus padres, con el carácter azaroso y libre de una biología no programada y no manipulada y el supuesto derecho de todo varón o mujer a un hijo biológico. La solución de emergencia ha creado la falsa expectativa de que toda persona, y en cualquier situación, puede reclamar un hijo sano y perfecto, en una sociedad que quiere entrar en la era de la genética personalizada. Las técnicas deberían, por tanto, permitir a los progenitores hacer un elenco de las características que desean para el hijo², incluyendo la selección eugenésica y la selección en pro de terceros.

Se discute, además, la conveniencia, o no, en la edad de la globalización, de emplear intervenciones de bajo coste económico para tratar la infertilidad en países de pocos recursos económicos en los que se aplican los programas de control de la natalidad³.

Es un proyecto de programación de la transmisión de la vida humana. De tal forma, que la percepción social de que existe un derecho natural al hijo hace crecer la percepción de un supuesto e imperioso deber de los profesionales de la salud de hacerlo posible mediante cualquier tipo de intervención.

La situación actual de las ART

La Medicina de la fertilidad ha avanzado poco en comparación con otras especialidades médicas. La causa principal es la apertura de esta vía peculiar de paliar la esterilidad sin curarla, que conlleva necesariamente una manipulación de los embriones. Han pasado 30 años de que se iniciara este falso atajo; y en este tiempo el protagonismo ha estado en los especialistas que se han dedicado a las llamadas técnicas de reproducción humana asistida.

Por diversos motivos la esterilidad y la infertilidad ha crecido hasta afectar al 15% de las parejas. Y al tiempo, en la percepción social, el deseo de un hijo se ha transformado en derecho a conseguir descendencia en pareja, o en solitario. Así la práctica de estas técnicas se ha convertido en un lucrativo negocio en el que no se exige garantía de lograr un embarazo y menos aún un nacimiento. La oferta actual en cualquier centro de Reproducción Asistida va desde la posibilidad de disponer de gametos de donantes anónimos, a la transferencia al útero de embriones previa selección de sus características, congelación-almacenamiento y diagnóstico previo a la transferencia de los embriones generados.

Existe un registro europeo de la "European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)", que publica cada año el estado de las ART en los centros pertenecientes a los diversos países que aportan los resultados. Las publicaciones realizadas en cada uno de los tres últimos años⁴, muestran un incremento considerable del número de ciclos de fertilización, además de la incorporación al registro de nuevos países, una mayor manipulación de los óvulos en el laboratorio, e incluye datos de inseminación homologa y heteróloga.

La situación de España sigue siendo, incluso en 2009, llamativa en una serie de aspectos respecto al resto de países. Por una parte, no aporta los datos de casi la mitad de los centros existentes. Se realizan en España un 10% de los ciclos de toda Europa (41.689 de 418.111). La proporción de ciclos por FIV tradicional frente a los realizados por inyección intra-citoplasmática de esperma (ICSI) es muy inferior en España; esta variante de la FIV, indicada para la infertilidad masculina, genera más problemas a la salud del hijo, precisamente por las limitaciones de los espermatozoides.

Por otra parte, la edad avanzada de la mujer es el principal factor de fracaso de las técnicas por lo que se acude a donantes jóvenes de óvulos. En el último registro, de los 11.475 ciclos con óvulos de donantes 5.875 son de España. Y corresponden a España 1.960 ciclos con PGD, de los 5.846 ciclos en centros europeos.

Existe una tendencia a restringir a un máximo de dos el número de embriones que se transfieren. La Reunión Anual de la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humanas de expertos, celebrada en Viena en junio de 2002, advirtió de la necesidad de reducir las gestaciones múltiples en mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida, debido a la evidencia del riesgo de prematuros y de mayor mortalidad de los hijos. Sin embargo, en España -a pesar de las múltiples indicaciones de transferir dos como máximo, y mejor uno sólo- sigue siendo más alto el porcentaje de ciclos con transferencia de tres embriones: un 31,7% frente a un 21,5% global. Se consigue un porcentaje más alto de embarazos por transferencia realizada (35,8% frente a 30,3% del total de Europa) y, sin embargo, el porcentaje de partos por transferencia es llamativamente el más bajo (12,1%) de Europa; e inferior a la media, incluso si los óvulos son donados por mujeres jóvenes.

El riesgo de taras de diverso tipo es mayor en gemelos o trillizos que en gestaciones de uno sólo; las transferencias múltiples en España se acompañan de la llamada reducción embrionaria consistente en la destrucción selectiva de embriones en embarazos múltiples. España ha realizado 107 de las 436 de toda Europa. El procedimiento de destruir alguno de los fetos en los embarazos múltiples es una aberración, también desde el punto de vista de la ciencia médica.

Por último, es bien conocido que el tratamiento de estimulación ovárica tiene riesgos⁵. Algunas mujeres (aproximadamente un 1%) presentan el Síndrome de Hiperovulación; la estimulación ovárica es un paso imprescindible en estas técnicas. En España se han producido, en el último año registrado, 183 casos de los 3347 del total. Se debe a una excesiva respuesta a las gonadotropinas exógenas para lo que no existe un test predictivo de sensibilidad riguroso que permita ajustar la dosis individualmente⁶. La forma severa de este Síndrome se caracteriza por un masivo crecimiento del ovario, fallo renal, distrés respiratorio y fenómenos tromboembólicos. Recientemente se ha confirmado el riesgo mayor de cáncer en las mujeres sometidas a este tipo de tratamiento hormonal⁷. Por último, hay que señalar la necesidad de rigor en la información a las jóvenes donantes de oocitos, ya que como se ha mostrado en estudios prospectivos⁸ con donantes de 15 a 18 años, existen complicaciones del proceso leves (8,5%) y graves (0,7%), y a un 9% de las donantes tuvieron que interrumpirles la estimulación ovárica después de haberla iniciado.

2. La asistencia profesional a la fertilidad y la objeción de ciencia

La ética médica encierra en si misma el respeto a unos valores esenciales a la dignidad humana. Los valores propios de la Medicina son capaces de guiar la actividad profesional dirigida a la atención del enfermo como persona, sin que sea deshumanizada por el sometimiento ciego al progreso tecnológico. La Ciencia ha cambiado, especialmente la biomedicina, pero el acto médico se dirige a la persona enferma, o limitada. Los medios de que dispone el facultativo han cambiado, pero la necesidad de realizar el juicio ético sobre el uso de las técnicas es universal y permanente. El arte de curar y paliar el sufrimiento, la ética del médico, exige subir dos escalones sin quedarse en el primero y sin tampoco saltárselo.

El primer escalón es conocer rigurosamente la ciencia de su tiempo; saber en profundidad qué es el proceso biológico natural que está alterado en el enfermo. Conocer

el porqué y el cómo de las acciones con que cuenta para restaurar la normalidad. Saberlo en profundidad no es sólo conocer, con precisión y detalle, los mecanismos implicados en el proceso; es saber su sentido natural en la unidad del cuerpo. La medida de este nivel de racionalidad (la racionalidad científica) es objetiva y tiene validez universal. El metro de medida del arte de curar es universal: adecuado o no a la corrección del proceso alterado y bien hecho técnicamente, o mal hecho. Tiene patrón de medida objetivo, que es neutro en cuanto universalmente válido, pero no es neutro en el sentido de ser equivalente una cosa y su contraria.

En segundo lugar, y sin dejar el primero, se requiere conocer la dimensión propiamente humana del hecho biológico concreto. Es el metro del juicio ético en el arte de curar. No es igual tratar un problema que tiene que ver con el filtrar del riñón, que con el funcionamiento de la corteza cerebral, o con la transmisión de la vida. Sólo así es posible saber que es lo que hace realmente al intervenir en tal proceso con el fin de curar o paliar la disfunción. La capacidad de establecer esa relación, el significado humano en cada acto concreto, es la racionalidad ética, que es exigible al arte de la medicina. La medida de cómo se establece tal relación tampoco es arbitraria o caprichosa. Ahora bien, las convicciones personales ayudan o dificultan a cada uno establecerla y acertar en su dimensión. Por tanto, puede afirmarse, sin dogmatismos, que detrás de una norma que plantea un problema de conciencia a un buen profesional hay un desconocimiento o una medida errónea en uno u otro, o en ambos niveles. Y, entonces, se precisa una búsqueda diligente comenzando con las "objeciones" de ciencia.

Objeciones de ciencia a las ART

Evidentemente, existe una línea divisoria entre las actuaciones encaminadas a curar la esterilidad interviniendo en sus causas, y las técnicas encaminadas a generar embriones y transferirlos al útero. Esa línea divisoria entre curar/paliar y generar artificialmente el hijo mediante cualquiera de las técnicas "in vitro", la traza la ciencia.

En primer lugar, en la Medicina de la fecundidad los pacientes son el hombre y/o la mujer que quieren hacerse mutuamente padres. Pero tratándose de la transmisión de la vida, el hijo es otra persona que, sea como fuere la forma y el modo con que llega a la vida, es un ser humano con el carácter personal propio y específico de todos y cada uno de los hombres. Los actos médicos que curan la infertilidad no acaban en los padres ya que el éxito de la actuación médica está en que ellos puedan engendrar un hijo. El tratamiento en sí de la infertilidad, ha de mirar a que las intervenciones no causen riesgo a la salud del hijo.

Por el contrario, la aplicación de las ART no es en sí un acto médico. El sujeto humano sobre el que "actúan" es justamente el embrión que producen desde gametos humanos. El equipo (biólogos, embriólogos, médicos, ginecólogos y técnicos de laboratorio) son productores de embriones para dar respuesta técnica al deseo de un hijo. Con la lógica de la producción, los embriones se generan en exceso para poder seleccionar, se experimenta en ellos para probar su cultivo, anidación, etc. No importa cuantos quedan en el camino sino cuantas mujeres o parejas consiguen el embarazo, o el hijo nacido. Se cumple así la que lo producido se presenta como destructible.

Conocemos bien que las relaciones paterno-filiares, familiares, son profundamente humanas y necesarias para la persona. Esta percepción es compartida por quienes profesan los más diversos credos y muy diferentes convicciones ideológicas. La paternidad-maternidad biológica ignorada por los donantes de gametos, el comercio de óvulos y el turismo reproductor, el incremento del DGP para elegir sexo o algunas características con eliminación de aquellos que no tienen las deseadas, etc., es en sí mismo un aviso de la dilución de las relaciones naturales familiares⁹.

Más aún, la alarma, cada vez más intensa de los Neonatólogos y Pediatras por el riesgo mayor de padecer enfermedades y malformaciones de los niños generados in vitro respecto a los engendrados, conlleva el deber de un examen riguroso de las consecuencias de la aplicación de las ART. Los datos, abundantes aunque aún cuantitativamente imprecisos, de los riesgos suponen una seria objeción de ciencia a la manipulación de la transmisión de la vida, y no pueden seguir siendo ignorados o diluidos.

3. Riesgos de salud en los niños nacidos por FIV-ICSI

En 1995 se publicaron los estudios del Medical Research Council que recogían los datos del primer año de vida de los nacidos desde 1978-1987¹⁰. Los niños procedentes de FIV, cuando se compararon con los concebidos naturalmente, presentaban un aumento -relativamente bajo- de malformaciones congénitas graves, aumento de secuelas neurológicas, como retraso mental y graves defectos de visión y un riesgo elevado de nacimiento prematuro (con las secuelas que le caracterizan). En cifras globales un 10% de los niños nacidos por FIV presentaban disfunciones, frente a menos del 5 % de los engendrados.

Desde finales de los años 90 y hasta el año 2003-2005 aparecen una serie de estudios que ponen de manifiesto un incremento del riesgo por la aplicación creciente de las ART; los datos no son siempre significativos y los estudios tienen diferente protocolo y tratamiento estadístico, y usan diferente tipo de controles para el análisis. Varias revisiones y meta-análisis recogen numerosos datos y ponen de manifiesto los diversos tipos de riesgos y destacan las causas¹¹. Actualmente, los datos sugieren que la causa principal es, por una parte, el estado de los gametos. La hiperestimulación ovárica deja los óvulos inmaduros, con defecto de su diferenciación; la transferencia de varios embriones para facilitar la anidación conlleva con frecuencia embarazos múltiples, que suponen el nacimiento de gemelos o trillizos de bajo peso. Por otra parte, la infertilidad tiene como causa principal el factor masculino; y de ella sólo el 1% es por fallo endocrino. El resto se debe a alteraciones genéticas, especialmente del cromosoma Y que pasa a los hijos varones, y que se acompaña de errores epigenéticos en el desarrollo embrionario.

El requerimiento de estimulación ovárica, con sus posibles alteraciones de la impronta parental, y las alteraciones de los espermatozoides potencian una combinación del genotipo parental deficiente para el complejo desarrollo embrionario del embrión generado. Los espermatozoides no requieren poseer capacidad fecundante ya que al ser introducidos directamente al óvulo lo fecundan aún cuando su estado sea deficiente¹². Las consecuencias en la fertilidad de los varones generados por ICSI no ha podido ser estudiada aún, ya que los primeros niños nacieron en 1992.

Un análisis de la bibliografía a 2008¹³ pone de manifiesto que existen datos que relacionan las ART con las gestaciones múltiples, anomalías congénitas, anormalidades hormonales y efectos epigenéticos. El riesgo absoluto es todavía bajo, pero no es insustancial. Deben ser dados a conocer los riesgos para la madre y los hijos antes de la decisión. Otras revisiones recientes¹⁴ analizan el riesgo de malformaciones congénitas, de defectos del desarrollo neurológico, salud física y psicosocial y riesgo de cáncer. Los principales factores de riesgo son las alteraciones que subyacen a la infertilidad, las técnicas mismas, la edad de la madre y especialmente están asociados a los embarazos múltiples y el bajo peso al nacer. Se abogan por el seguimiento de los niños hasta la adolescencia y la edad adulta y llaman de nuevo la atención a que no se realice la transferencia de más de un embrión¹⁵.

Malformaciones congénitas

Un meta-análisis¹⁶ sobre 19 estudios publicado en 2004 aportaba el dato de un incremento de aproximadamente el 29% de malformaciones en niños generados in vitro y realizan recomendaciones acerca de los controles que permitan sacar conclusiones con rigor. Posteriormente, varios equipos describen el mayor riesgo de malformaciones congénitas en los niños generados por las ART¹⁷. Otro estudio recoge la mayor incidencia de gemelos con malformaciones patológicas del cordón umbilical en los 4.159 nacidos y registrados entre 1985 y 2004, en el Este de Flandes; de ellos 2.119 fueron engendrados normalmente y otros 2.243 pares de gemelos tuvieron su origen con las ART¹⁸.

Un estudio multicéntrico¹⁹ con los datos del Nacional Birth Defects Prevention Study de USA, en el periodo de Octubre de 1997 a Diciembre de 2003, compara madres de niños con defectos frente a madres de hijos sin defectos que usan o no las ART. Los nacidos únicos por ART se asocian con riesgo mayor de malformaciones cardíacas, labio leporino, paladar abierto, malformaciones anorrectales y del esófago. Las diferentes malformaciones tienen diverso nivel de riesgo (el factor de riesgo es 9.85 para las gastrointestinales, 2.30 para las cardiovasculares y 1.54 para los defectos musculoesqueléticos. Y también las diversas técnicas tienen diferente factor de riesgo²⁰: 2.35% por la estimulación ovárica, 2.89% para la inseminación intrauterina y 3.45%, en la fecundación in vitro. Entre otros estudios, es de la Universidad de Iowa, encuentra defectos en un 6.2% de 1.500 niños concebidos por FIV en contraste con un 4.4% de niños engendrados naturalmente²¹.

En estudios que se realizan sobre una muestra pequeña de niños es frecuente, lógicamente, no encontrar alteraciones. Los datos no son estadísticamente significativos y abogan por una no existencia de mayor riesgo de malformaciones en los generados aplicando las ART. Por ejemplo, un artículo²² que recoge bibliografía y aporta los resultados de 151 niños generados por ART de los que se presenta un caso de trisomía (0.66%) y otro con el Síndrome de Potter (0.66%).

Es sabido que hasta en un 60% de los abortos espontáneos el feto presenta alteraciones cromosómicas incompatibles con la vida. Un artículo²³ compara un total de 277 casos de abortos espontáneos de los que 133 proceden de las ART y 144 son de parejas infértiles, que conciben naturalmente tras tratamiento. Observan cariotipos anormales en un 63.2% de los primeros y un 71.5% en los segundos; la cifra alcanza el 80% cuando se ha aplicado la ICSI con una extracción directa del esperma de los testículos, y un 85.7% tras inseminación al útero. Se deducen que la causa no es la aplicación de la tecnología in vitro, sino los defectos de los gametos de los progenitores, por lo que plantean que no es necesaria la información de los riesgos de malformaciones a las parejas que acuden a que se les apliquen tales tecnologías.

La cuestión es que tanto la inseminación como la fecundación in vitro permiten, al forzar la capacidad fecundante de los espermios, que se inicie un desarrollo embrionario sumamente deficiente, que sin esa intervención no hubiera ocurrido. Parece imprescindible informar de la objeción de ciencia a estas técnicas, que por ser tan fuertemente invasivas hay riesgos para la salud del hijo conseguido.

ICSI y herencia de alteraciones genéticas paternas

La esterilidad masculina tiene como indicación del uso de la ICSI. Un informe exhaustivo de febrero de 2005²⁴ del Ministerio de Salud de Nueva Zelanda, recoge los datos publicados en todos los países sobre la salud de los niños generados por FIV e ICSI y pone de manifiesto que estos últimos tienen más riesgo de tres a cuatro veces mayor que los concebidos naturalmente de anomalías cromosómicas. En buena medida las alteraciones son heredadas de los gametos paternos.

Los trabajos del equipo de Bonduelle²⁵ analizan el riesgo de una anomalía cromosómica nueva, no presente en los gametos; encuentran que es de 1.6% para los generados por ICSI frente a un 0.5% de los concebidos. Estas alteraciones fetales de novo consisten fundamentalmente en un incremento del número de cromosomas sexuales, que cursan con esterilidad, y sus manifestaciones fenotípicas son indetectables al nacer y en los primeros años de vida. Se ha relacionado la incidencia de alteraciones en los niños de ICSI con alteraciones del cromosoma Y paterno²⁶. Actualmente, las técnicas de biomedicina están permitiendo la disección de los genes del cromosoma Y que se requieren para la fertilidad masculina; este análisis permitirá un mejor diagnóstico de la causa de infertilidad y permitiría la posibilidad de una información rigurosa a quienes acuden a la ICSI y valorar con ello las malformaciones esperables en los hijos.

Una amplia revisión²⁷ de los riesgos de transmisión de enfermedades genéticas pone de manifiesto que un 6% de los varones estériles tienen un cariotipo con anomalías del tipo de trisomías de los cromosomas sexuales. Por ejemplo el Síndrome de Klinefelter, que ocurre en 1 por 500 varones vivos, afecta al 14% de los hombres con azoospermia no-obstrutiva. En otros casos son reordenaciones cromosómicas debidas a traslocaciones, inversiones y deleciones. También se ha descrito²⁸ que el 6.1% (134 de 2.190 varones) de los que necesitaron ICSI para concebir tenían una reordenación cromosómica. La frecuencia es más alta (18.71%) en varones con azoospermia que en los que tienen severa (14.55%) o moderada (2.37%) oligozoospermia. Otro defecto en los que padecen azoospermia no obstructiva, o oligospermia severa, es una deleción en el cromosoma Y en una región Yq11 (AZF) que contiene genes implicados en la espermatogénesis²⁹. En el 1-2% de varones estériles hay una mutación en el gen regulador de la conductancia de la membrana (CFTC) que origina una forma genital de la fibrosis quística.

La edad de las mujeres que acuden a las ART es generalmente mayor que las que conciben espontáneamente, por lo que los hijos tienen alteraciones cromosómicas en mayor proporción. Sin embargo, se ha encontrado un aumento significativo de aberraciones cromosómicas tras ICSI respecto a FIV en un estudio que abarca el registro desde 1995-2000 en Dinamarca³⁰, incluso si la madre era más joven. 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 ART. Se ha observado que este proceso no incrementa el riesgo de alteraciones congénitas, embarazos múltiples, partos por cesárea, mayor siempre respecto a los nacidos concebidos naturalmente³¹. No obstante, cuando la esterilidad femenina se debe a ovario poliquístico, la maduración de los óvulos in vitro lleva consigo pérdidas del embrión muy altas, tanto si se generan por FIV como por ICSI³².

Alteraciones epigenéticas

Durante la gametogénesis tienen lugar una reprogramación de determinadas regiones del DNA, mediante un proceso de metilación de las citosinas que ocupan posiciones concretas en las zonas reguladoras de la expresión de genes. Estos genes, denominados genes con impronta, sufren reprogramación epigenética en la línea germinal y son necesarios para el normal desarrollo del embrión. La impronta, que es diferente en el cromosoma paterno y materno de cada par, supone que el embrión sólo puede usar una de las copias durante las primeras etapas de su desarrollo, específicamente la paterna o la materna. La desregulación de los genes con impronta conlleva desordenes del crecimiento de la placenta, causa un crecimiento intrauterino reducido y se relaciona con varios síndromes y riesgo de algunos tipos de cáncer.

Trabajos con animales muestran que el cultivo de embriones alteran los genes con impronta del embrión³³. Paolo F. Rinaudo³⁴, encuentra que el cultivo de embriones de ratón en el laboratorio es suficiente para alterar la expresión de varios genes con

impronta y que el efecto depende de .las condiciones del medio. Uno de ellos el gen H19 se reprime y está asociado con el síndrome Beckwith Wiedeman; es un gen regulador del desarrollo, supresor de tumores. El Copg2, del transporte de proteínas está asociado con el síndrome de Silver-Russell, desorden del crecimiento que ocurre en 1 de 75.000 nacimientos. El gen Gnas, de las vías de señalización celular, está asociado con el síndrome de McCune-Albright, que cursa con anomalías del hueso, hormonales y de piel, con el síndrome de pseudohipoparatiroidismo, y adenomas que segregan la hormona de crecimiento.

En el genoma humano están presentes unos 200 genes con impronta y se desconoce el papel que juegan en la salud. Hay 9 síndromes descritos causados por defectos de la impronta de los que 3 se han asociado a FIV: Beckwith–Wiedemann, Angelman, y el de hipometilación. Las ATR desregulan la expresión de genes con impronta del desarrollo embrionario³⁵. Se discute si el efecto está asociado a las técnicas o a defectos en el patrón de metilación de los gametos de pacientes con esterilidad. Obviamente, es imprescindible un buen conocimiento de la reprogramación epigenética de la línea germinal para saber la seguridad de las ART, especialmente la ICSI³⁶, y los procedimientos de tratamiento de la infertilidad. Se conoce, de hecho, muy poco acerca del cambio de la impronta en la maduración natural, o in vitro, de los gametos³⁷. La causa puede ser la infertilidad misma, la estimulación ovárica y la manipulación del embrión³⁸.

El síndrome Beckwith-Wiedeman se caracteriza por nacimiento prematuro, con una lengua anormalmente larga, hernia umbilical, hipoglucemia neonatal, y predisposición a tumores, como hepatoblastoma y el de Wilms, un raro tumor que afecta a uno por cada 36.000 nacidos³⁹. Afortunadamente este síndrome afecta a uno por cada 12.000 nacidos. Sin embargo, algunos estudios muestran una asociación más alta en los nacidos por las técnicas de FIV. Se ha encontrado en 3 de 65 niños nacidos por FIV en EEUU⁴⁰; en otro estudio se han detectado 6 de 149 niños del registro medico de Inglaterra y Francia nacidos por IVF y especialmente ICSI⁴¹. Se ha llevado a cabo el análisis de 19 niños⁴² con síndrome Beckwith-Wiedeman generados por ART de bajo peso y comparado con 29 de peso normal concebidos de forma normal. De los 29, 10 niños con el síndrome Beckwith-Wiedeman no fueron unicos; 5 fueron generado con ICSI; uno concebido tras tratamiento con clomifeno y posterior inseminación y otro con estimulación ovárica con gonadotropina previa a la inseminación intrauterina. Solamente tienen todos en común la estimulación ovárica de la madre. Y detectaron en uno de los niños una clara hipermetilación en el gen con impronta KCNQ1OT1 implicado en el control del crecimiento fetal y un valor límite de hipermetilación del PEG1 de ICSI. Se precisa estudiar más locis con impronta para asegurar la relación con este síndrome con la estimulación ovárica, la maduración de los gametos, el medio de cultivo, y el tiempo de la transferencia del embrión.

Además de al cultivo de los embriones, los defectos de la impronta se asocian al bajo peso a término⁴³ de los niños generados por FIV. Es importante⁴⁴ señalar que el 90% de los niños con el síndrome Beckwith-Wiedeman nacidos por la ART, tienen defectos de la impronta, comparado con el 40–50% de los niños con este síndrome engendrados sin las ART. Más aún, existe relación entre síndrome de Angelman y las ART.

El síndrome de Angelman se caracteriza por un retraso mental grave, excitabilidad, microcefalia, movimientos espasmódicos, ausencia de habla, y un grave retraso mental. Se presenta en uno por cada 10.000 a 30.000 nacidos. Se describió que el tratamiento de infertilidad con (ICSI) en parejas subfértiles aumenta el riesgo de los defectos de la impronta asociados a este síndrome⁴⁵; probablemente es debido a la estimulación ovárica que cambie la impronta en genes de la copia materna del cromosoma 15, lo que origina que UBE3A pierda su la función en el cerebro, donde sólo se expresa la copia materna.

Riesgo de cáncer

Un solo artículo⁴⁶ -que no ha sido contestado- 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 17.000. Un meta análisis⁴⁷ ha centrado la atención en las técnicas que han dado incremento del riesgo de cáncer en los niños, sin considerar las consecuencias de las hormonas administradas a la madre con problemas de esterilidad. Se conforma de nuevo⁴⁸, que los efectos adversos más que en las técnicas en sí, están en el estado de los genes y su expresión en los gametos. Se ha descrito en Suecia⁴⁹ que la morbilidad a largo plazo es mayor por efecto de las ART que en los nacidos espontáneamente. El estudio abarca 16.000 niños de ART de los que el 30% eran de ICSI. Para esa muestra eran de esperar 21 con cáncer y resultaron 29.

Riesgos a largo plazo

Algunos estudios ponen de manifiesto que el nivel de salud es similar entre los nacidos únicos⁵⁰ generados por ICSI, que en los de FIV y que los concebidos de forma natural a edades entre 5 y 8 años, a pesar de que los defectos (prematuridad, bajo peso, crecimiento, consumo de medicamentos, malformaciones) son más marcados en el periodo perinatal.

Otros trabajos, por el contrario, ponen de manifiesto que las condiciones adversas en la vida prenatal se asocian posteriormente con el desarrollo de enfermedades crónicas en la vida adulta. El análisis de la composición corporal⁵¹ en nacidos únicos por FIV de edades entre 8 y 18 años y concebidos por padres subfértiles, muestran desequilibrios en la composición de la grasa corporal. Se insiste, por ello, en seguir los estudios a largo plazo e incluir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares⁵². Los hijos de parejas subfértiles, con tratamiento hormonal de un año, tienen mayor riesgo de epilepsia y ataques febriles que los que lo han tenido menos de 5 meses y que los que conciben espontáneamente⁵³. También en chicas adolescentes, a diferencia e los chicos, generados por FIV, tienen desequilibrios hormonales, manifestados en niveles elevados de dehydroepiandrosterone y LH⁵⁴.

4. Conclusiones

La creciente aplicación de las ART, las alertas médicas respecto a la salud de las mujeres sometidas a estimulación ovárica, y las alertas de pediatras acerca de la frecuencia de malformaciones, y otras alteraciones, en los nacidos de padres con problemas de esterilidad exige una responsabilidad de los profesionales, Y exige un serio estudio por parte de la Comisión Nacional de Reproducción Asistida, tanto en lo que se refiere a exigir el registro completo de cada centro de Reproducción Asistida, como para dar o negar el visto bueno a la ampliación de las ofertas que plantean los centros. De hecho, no se están exigiendo las recomendaciones internacionales para prevenir algunos aspectos de la inseguridad de las técnicas. Un factor obvio en España es la composición de la Comisión Nacional, que tiene el encargo del seguimiento, en la que están representados, en exceso, los intereses de los propios centros privados.

Una reiterada recomendación internacional es evitar embarazos múltiples, reduciendo la estimulación ovárica y transfiriendo un solo embrión, puesto que es ésta la principal causa de malformaciones y características adversas al nacer⁵⁵. Diversos estudios muestran que los gestados únicos tienen menores riesgos de alteraciones de la impronta y otros problemas que los gemelos o trillizos⁵⁶.

Se requiere mejorar las técnicas y, partiendo de un buen diagnóstico de las causas de esterilidad, poder definir una indicación clara para la FIV y la ICSI a fin de minimizar los

riesgos asociados al carácter invasivo de estos procedimientos⁵⁷. Para ello, se debería atender el ofrecimiento de pediatras y obstetras de colaborar con los centros de Reproducción Asistida para llevar a cabo análisis longitudinales de las malformaciones congénitas, el desarrollo neurológico, crecimiento, maduración en la pubertad, fertilidad y estado de salud de los niños generados por FIV, y especialmente por ICSI.

La información a los que acuden para ser padres tendría que incluir los posibles efectos sobre la salud de los hijos⁵⁸, y un consejo claro negativo si las causas de esterilidad son de origen genético. El incremento de la demanda de acceso a las ART y a los servicios de diagnósticos genéticos -cuando las causas de infertilidad son de origen genético- ha adquirido una dimensión que implica no solo a las personas individuales y a las familias sino también a la sociedad, especialmente a la comunidad biosanitaria. Toda sociedad debe tener presente las graves reservas éticas de una investigación sobre las primeras etapas del desarrollo embrionario humano, que conllevan destrucción de los embriones. Sin embargo, la "European Society of Human Genetics" (ESHG) y la "European Society of Human Reproduction and Embryology" (ESHRE), han unido sus esfuerzos⁵⁹ para maximizar los esfuerzos en beneficio de las parejas con problemas de fecundidad, pero sin prestar atención al beneficio del hijo.

Es también imprescindible, por tanto, una información clara a la sociedad acerca del estado de la tecnología del diagnóstico previo a la implantación. Un artículo del 2008⁶⁰ muestra como las páginas web de los centros que ofrecen el PGD informan enfatizando los beneficios y minimizando los riesgos. De las páginas analizadas, el 76% describen los test para enfermedades monogénicas, pero muy pocas mencionan el riesgo de error del diagnóstico que es del 35%, o el riesgo de pérdida del embrión que es de un 18%. Sin embargo, es obvio, que es imposible escanear los embriones para cada defecto conocido a fin de desechar el que tenga alguno, lo que debería saberse. Tanto para parejas estériles como fértiles la tecnología actual está muy lejos de satisfacer la expectativa creada de obtener el "bebé perfecto".

Natalia López Moratalla

¹ Pearson H. (2008) "Making babies: the next 30 years". *Nature*, 454, 260-262.

² Editorial del 17 Julio de 2008. "Life after SuperBabe". *Nature* 454, 253.

³ Pennings, G., de Wert, G., Shenfield, F., Cohen, J., Tarlatzis, B., Devroey, P. (2009) "Providing infertility treatment in resource-poor countries. ESHRE Task Force on Ethics and Law including". *Human Reproduction*, 1, 1-4.

⁴ Andersen, N.A., Goossens, V., et al. (2007) "Assisted reproductive technology in Europe, 2003". *Human Reproduction* 22, 1513-1525; Andersen, N. A., Goossens, V. et al. (2008) "Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE". *Human Reproduction*, 23, 756-771; Andersen A. N., Goossens, V. Bhattacharya, S., Ferraretti, A.P., Kupka, M.S., de Mouzon, J., Nygren, K.G. (2009) "Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005". *Human Reproduction*, 1, 1-21; Schieve L.A., Cohen, B., et al., and Massachusetts Consortium for Assisted Reproductive Technology Epidemiologic Research (MCARTER) (2007) "A Population-Based Study of Maternal and Perinatal Outcomes Associated with Assisted Reproductive Technology in Massachusetts". *Matern Child Health J*, 11, 517-525.

⁵ Kallen B. (2008) "Maternal morbidity and mortality in in-vitro fertilization". *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 22, 549-558.

⁶ Delbaere, A., Smits, G., Vassart, G., Costagliola, S. (2006) "Genetic predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing in vitro fertilization". *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 2, 590-591.

⁷ Calderon-Margalit, R., Friedlander, Y., Yanetz, R., Kleinhaus, K., Perrin, M. C., Manor, O., Harlap, S., Paltiel, O. (2009) "Cancer Risk After Exposure to Treatments for Ovulation Induction" *Am J Epidemiol.*, 169, 365-375. Cfr. entre otros: Brinton, L.A., Lamb, E.J., Moghissi, K.S., et al. (2004) "Ovarian cancer risk after the use of ovulation-stimulating drugs". *Obstet Gynecol.* 103, 1194-1203; Rossing, M.A., Tang, M.T., Flagg, E.W., et al. (2004) "A case-control study of ovarian cancer in relation to infertility and the use of ovulation-inducing drugs.

Am J Epidemiol., 160, 1070–1078; Lerner-Geva, L., Keinan-Boker, L., Blumstein, T., et al. (2006) “Infertility, ovulation induction treatments and the incidence of breast cancer—a historical prospective cohort of Israeli women. *Breast Cancer Res Treat.* 100, 201–212; Kashyap, S., Moher, D., Fung, M.F., et al. (2004) “Assisted reproductive technology and the incidence of ovarian cancer: a meta-analysis”. *Obstet Gynecol.* 103, 785–794; Althuis, M.D., Moghissi, K.S., Westhoff, C.L., et al. (2005) “Uterine cancer after use of clomiphene citrate to induce ovulation”. *Am J Epidemiol.* 161, 607–615. Rutqvist, L.E., Johansson, H., Stockholm Breast Cancer Study Group. (2007) “Long-term follow-up of the randomized Stockholm trial on adjuvant tamoxifen among postmenopausal patients with early stage breast cancer”. *Acta Oncol.*, 46, 133–145. Hannibal, C.G., Jensen, A., Sharif, H., et al. (2008) “Malignant melanoma risk after exposure to fertility drugs: results from a large Danish cohort study. *Cancer Causes Control.*, 19, 759–765.

⁸ Maxwell, K.N., Cholst, I. N., Rosenwaks, Z. (2008) “The incidence of both serious and minor complications in young women undergoing oocyte donation”. *Fertil Steril*, 90, 2165–2171.

⁹ Olivennes, F., Ramogidas, S., Golombok, S. (2004) “Children’s cognitive development and family functioning in a large population of IVF/ICSI twins”. *Fertility and Sterility*, 82 (Supplement 2), S37-S37; Ponjaert-Kristoffersen, I, Tjus, T., Nekkebroeck, J., Squires, J., Verte, D., Heimann, M. et al. (2004) Psychological follow-up study of 5-year-old ICSI children. *Human Reproduction*, 19, 2791-2797; Barnes, J., Sutcliffe, A.G., Kristoffersen, I., Loft, A., Wennerholm, U., Tarlatzis, B.C., et al. (2004) “The influence of assisted reproduction on family functioning and children’s socio-emotional development: results from a European study”. *Human Reproduction*, 19, 1480-1487.

¹⁰ Verlaenen, H., Cammu, H., Derde, M.P., Amy, J. (1995) “MRC Working Party on Children Conceived by In vitro Fertilisation”. *J. Obstet. Gynecol.* 86, 906-910.

¹¹ Hansen, M., Bower, C., Milne, E., de Klerk, N., Kurinczuk, J.J. (2005) “Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review”. *Hum Reprod*, 20, 328–338; Hansen, M. et al. (2007) “Practitioner reporting of birth defects in children born following assisted reproductive technology: does it still have a role in surveillance of birth defects?” *Hum Reprod*, 22, 516–520; Lie, R.T., Lyngstadaas, A., Orstavik, K.H., Bakketeig, L.S., Jacobsen, G., Tanbo, T. (2005) “Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis”. *Int J Epidemiol*; 34, 696–701; Reefhuis, J., Honein, M.A., Schieve, L.A., Correa, A., Hobbs, C.A., Rasmussen, S.A. and the National Birth Defects Prevention (2005) “Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States” *TheScientificWorldJOURNAL* 5, 922–932; Schieve, L.A., Rasmussen, S.A., Reefhuis, J. (2005) “Risk of birth defects among children conceived with assisted reproductive technology: providing an epidemiologic context to the data”. *Fertil Steril*, 84, 1320–1324; Reddy UM et al. (2007) “Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop”. *Obstet Gynecol*, 109: 967–977; Zhu, J.L., Basso, O., Obel, C., Hvidtjørn, D., Olsen, J. (2009) “Infertility, infertility treatment and psychomotor development: the Danish National Birth Cohort”. *Paediatric and Perinatal Epidemiolog*, 23, 98–106.

¹² 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. (2005) “A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception”. *Human Reproduction*, 20, 413-419; Mau, C., Juul, A., Mainm, K.M., Loft, A. (2004) “Children conceived after intracytoplasmic sperm injection (ICSI): is there a role for the paediatrician?” *Acta Paediatr* 93, 1238-1244.

¹³ Alukal, J.P., Lipshultz, L.I. (2008) “Safety of assisted reproduction, assessed by risk of abnormalities in children born after use of *in vitro* fertilization techniques”. *Nature Clinical Practice UROLOGY*, 5, 140-150.

¹⁴ Basatemur, E., Sutcliffe A. (2008) “Follow-up of Children Born after ART”. *Placenta* 29, S135–S140.

¹⁵ Pinborg, A., Loft, A., Andersen, A.N. (2004) “Neonatal outcome in a Danish national cohort of 8602 children born after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection: the role of twin pregnancy”. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 83, 1071-1078.

¹⁶ Rimm, A.A., Katayama, A.C., Diaz, M., Katayama K. P. (2004) “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, 437-443.

¹⁷ Zhu, J.L., Basso, O., Obel, C., Bille, C., Olsen, J. (2006) “Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort”. *BMJ*, 333-679; doi:10.1136/bmj.38919.495718.AE; Midrio, P., Nogare, C.D., Di Gianantonio, E., Clementi, M. (2006) “Are congenital anorectal malformations more frequent in newborns conceived with assisted reproductive techniques?” *Reprod Toxicol*, 22,576–577; Green, N.S. (2006) “Risks of Birth Defects and Other Adverse Outcomes Associated With Assisted Reproductive Technology” *Pediatrics*, 114, 256-259; Wood, H.M., Babineau, D., Gearhart, J.P. (2007) “In vitro fertilization and the cloacal/bladder exstrophyepispadias complex: A continuing association”. *J. of Pediatric Urology* 3, 305-310.

- ¹⁸ Delbaere, I., Goetgeluk, S., Derom, C., De Bacquer, D., De Sutter, P., Temmerman, M (2007) "Umbilical cord anomalies are more frequent in twins after assisted reproduction" *Human Reproduction*, 22, 2763–2767.
- ¹⁹ Reefhuis, J., Honein, M.A., Schieve L.A., Correa, A., Hobbs, C.A., Rasmussen S.A., (2008) "Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States" *Human Reproduction*, 1-7; doi:10.1093/humrep/den387 .
- ²⁰ El-Chaar, D., Yang, Q., Gao, J., Bottomley, J., Leader, J.A., Wen, S. W., Walker, M. (2008) "Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction" . *Fertil Steril* (en prensa).
- ²¹ Klemetti R *et al.* (2005) "Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies". *Fertil Steril*, 84, 1300–1307; cfr además: Merlob, P., Sapir, O., Sulkes, J., Fisch B. (2005) "The prevalence of major congenital malformations during two periods of time, 1986–1994 and 1995–2002 in newborns conceived by assisted reproduction technology" *Eur. J. Med. Gen.* 48. 5–11; Olson, C.K., Keppler-Noreuil, K.M., Romitti, P.A., Budelier, W.T., Ryan, G., Sparks, A.E., Van Voorhis, B.J. (2005) "In vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects". *Fertil Steril*, 84, 1308–1315; Clementini, E., Palka, C., Iezzi, I., Stuppia, L. *et al.* (2005) "Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques". *Human Reproduction*, 20, 437-442.
- ²² Hammadeh, M.E., Ertan, K., Rosenbaum, P., Schmid, W. (2007) "Comparison Between Children Born After Natural Conception and Those Born After Assisted Reproduction Technology: A Review of the Literature and Results from our Survey". *J Turkish-German Gynecol Assoc*, 8, 94-110.
- ²³ Bettio, D., Venci, A., Levi Setti, P.E. (2008) "Chromosomal Abnormalities in Miscarriages after Different Assisted Reproduction Procedures". *Placenta*, 29, S126–S128.
- ²⁴ Marjoribanks, J., Farquhar, C., Marshall C. (2005) 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.
- ²⁵ Bonduelle, M., Van Assche, E., Joris, H., Keymolen, K., Devroey, P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. (2002) "Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters". *Human Reproduction*, 17, 2600-2614; Bonduelle, M., Liebaers, I., Deketelaere, V., Derde, M.P., Camus, M., Devroey, P., *et al.* (2002) "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, 671-694. Bonduelle, M., Ponjaert, I., Van Steirteghem, A., Derde, M.P., Devroey, P., Liebaers I. (2003) "Developmental outcome at 2 years of age for children born after ICSI compared with children born after IVF". *Human Reproduction*, 18, 342-350; Bonduelle, M., Bergh, C., Niklasson, A., Palermo, G.D., Wennerholm, U.B. (2004) "Medical follow-up study of 5-year-old ICSI children". *Reproductive Biomedicine Online*, 9. 91-101; cfr. también: Lancaster, P.A. (2004) "Major congenital malformations after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a population-based register". *Fertility and Sterility*, 82 (Supplement 2) S45-S45; Katalinic, A., Rosch, C., Ludwig, M., German, IF (2004) "Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection: a controlled, prospective cohort study". *Fertility and Sterility*, 81, 1604-1616.
- ²⁶ Katagiri, Y., Neri, Q.V., Takeuchi, T., Schlegel, P.N. (2004) "Y chromosome assessment and its implications for the development of ICSI children". *Reproductive Biomedicine Online* 3, 307-318.
- ²⁷ Lipshultz, L.I., Lamb D. J. (2007) Risk of transmission of genetic diseases by assisted reproduction. *Nature Clinical Practice Urology* 4, 460-461.
- ²⁸ Gekas, J. *et al.* (2001) "Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men". *Hum Reprod*, 16, 82–90.
- ²⁹ Tiepolo, L., Zuffardi, O. (1976) "Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm". *Hum Genet* 34, 119–124; Reijo, R. *et al.* (1996) "Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome". *Lancet* 347, 1290–1293.
- ³⁰ Gjerris, A.C., Loft, A. Pinborg, A., Christiansen, M., Tabor, A. (2008) "Prenatal testing among women pregnant after assisted reproductive techniques in Denmark 1995–2000: a national cohort study". *Human Reproduction* 23, 1545–1552.
- ³¹ Buckett, W.M., Chian, R-C., Holzer, H., Dean, N., Usher, R., Lin Tan, S. (2007) "Obstetric Outcomes and Congenital Abnormalities After In Vitro maturation, In Vitro Fertilization, and Intracytoplasmic Sperm Injection". *Obstet Gynecol*, 110, 885–891.
- ³² Buckett, W.M., Chian, R.-C., Dean, N.L., Sylvestre, C., Holzer, H. E. G., Lin Tan, S. (2008) "Pregnancy loss in pregnancies conceived after in vitro oocyte maturation, conventional in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection". *Fertil Steril*, 90, 546–550.
- ³³ Fauque, P., Jouannet, P., Lesaffre, C., Ripoche, M.A., Dandolo, L., Vaiman, D., *et al.* (2007) "Assisted reproductive technology affects development kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos". *BMC Dev Biol*, 18, 116; Zaitseva, I., Zaitsev, S., Alenina, N., Bader, M., Krivokharchenko, A. (2007) "Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed

in vivo and in vitro". *Mol Reprod Dev*, 74, 1255–1261; Hiendleder, S., Wirtz, M., Mund, C., Klempt, M., Reichenbach, H.D., Stojkovic, M., et al. (2006) "Tissue-specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses". *Biol Reprod*;75, 17–23; Huang, J.C., Lei, Z.L., Shi, L.H., Miao, Y.L., Yang, J.W., Ouyang, Y.C., et al. (2007) "Comparison of histone modifications in in vivo and in vitro fertilization mouse embryos". *Biochem Biophys Res Commun*, 354, 77–83; Rivera, R.M., Stein, P., Weaver, J.R., Mager, J., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S. (2008) "Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development". *Hum Mol Genet*, 17, 1–14.

³⁴ Giritharan, G., Talbi, S., Donjacour, A., Di Sebastiano, F., Dobson A.T. Rinaudo, P. F. (2007) "Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos". *Reproduction*, 134, 63–72.

³⁵ Bowdin, S., Allen, C., Kirby, G., Brueton, L., Afnan, M., Barratt, C., et al. (2007) "A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders". *Hum Reprod*, 22, 3237–3240; Doornbos, M.E., Maas, S.M., McDonnell, J., Vermeiden, J.P.W., Hennekam, R.C.M., (2007) "Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study". *Hum Reprod*, 22, 2476–2480; Thompson, J.R., Williams, C.J. (2005) "Genomic imprinting and assisted reproductive technology: connections and potential risks". *Semin Reprod Med*, 23, 285–295; Li, T., Vu, T.H., Ulaner, G.A., Littman, E., Ling, J.Q., Chen, H.L., et al. (2005) "IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch". *Mol Hum Reprod*, 11, 631–640.

³⁶ Cox, G.F., Burger, J., Lip, V., Mau, U.A., Sperling, K., Wu, B.-L., Horsthemke, B. (2002) "Intracytoplasmic Sperm Injection May Increase the Risk of Imprinting Defects". *Am. J. Human Gen.* 71,162-164.

³⁷ Borghol, N., Lornage, J., Blachere, T., Garret, A.S., Lefevre, A. (2006) "Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation". *Genomic*, 87, 417–426; Geuns, E., Hilven, P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., De Rycke, M. (2007) "Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes". *J Med Genet*, 44, 144–147. Sato, A., Otsu, E., Negishi, H., Utsunomiya, T., Arima, T. (2007) "Aberration DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes". *Hum Reprod*, 22, 26–35; Kobayashi, H., Sato, O.E. (2007) "Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients". *Hum Mol Genet*;16, 2542–2551; Marques, C.J., Carvalho, F., Sousa, M., Barros, (2004) "A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis". *Lancet*, 363, 1700–1702.

³⁸ Amor, D.J. (2009) "Genomic imprinting, small babies and assisted reproduction". *Eur. J Human Genetics* 17, 1–2; Paoloni-Giacobino, A. (2007) "Epigenetics in Reproductive Medicine". *PEDIATRIC RESEARCH*, 61, 51R–57R;; 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. (2006) "Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method". *Asian J Androl*, 8, 643–673; Sutcliffe, A.G., Peters, C.J., Bowdin, S., Temple, K., Reardon, W., Wilson, L., et al. (2006) "Assisted reproductive therapies and imprinting disorders—a preliminary British survey". *Hum Reprod*, 21, 1009–1011.

³⁹ Lucifero, D., Chaillet, J.R., Trasler, J.M. (2004) "Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology". *Human Reproduction Update*, 10, 3-18.

⁴⁰ DeBaun, M.R., Niemitz, E.L., Feinberg, A.P. (2003) "Association of In Vitro Fertilization with Beckwith-Wiedemann Syndrome and Epigenetic Alterations of LIT1 and H19". *Am. J. Hum. Genet.* 72, 156–160.

⁴¹ Gicquel, C., Gaston, V., Mandelbaum, J., Siffoi, J.P., Flahault, A., Le Bouc, Y. (2003) "In Vitro fertilization May Increase the Risk of Beckwith-Wiedemann Syndrome Related to the Abnormal Imprinting of the KCNQ10T". *Am. J. Hum. Genet.*, 72, 1338–1341.

⁴² Chang, A.S., Moley, K.H., Wangler, M., Feinberg, AP., DeBaun, M.R. (2005) "Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients". *Fertil Steril*, 83, 349–354; Maher, E.R., Brueton, L.A., Bowdin, S.C., Luharia, A., Cooper, W., et al. (2003) "Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART)". *J. Med. Genetics*, 40, 62-64; Halliday, J., Oke, K., Breheny, S., Algar, E., Amor, D.J. (2004) "Beckwith-Weidemann syndrome and IVF: a case-control study". *Am. J. Hum. Genet.*, 75, 526–528.

⁴³ Kanber, D., Buiting, K., Zeschnick, M., Ludwig, M., Horsthemke, B. (2009) "Low frequency of imprinting defects in ICSI children born small for gestational age". *Eur. J. Human Gen.* 17, 22–29.

⁴⁴ Manipalviratn, S., DeCherney, A., Segars, J. (2009) "Imprinting disorders and assisted reproductive technology". *Fertil Steril*, 91,305–315.

⁴⁵ Ludwig, M., Katalinic, A., Groß, S. Sutcliffe, A., Varon, R., Horsthemke, B. (2005) "Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples". *J Med Genet*, 42, 289–291; Orstavik, K.H., Eiklid, K., van der Hagen, C.B., Spetalen, et al. (2003) "Another case of imprinting defect in a

girl with Angelman Syndrome who was conceived by intracytoplasmic sperm injection". *Am. J. of Humen Gen.*, 72, 218-219.

⁴⁶ Moll, A.C., Imhof, S.M., Cruysberg, J.R.M., Schouten-van Meeteren, A.Y.N. et al. (2003) "Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation". *The Lancet*, 361, 309-310.

⁴⁷ Raimondi, S., Pedotti, P., Taioli, E. (2005) "Meta-analysis of cancer incidence in children born after assisted reproductive technologies". *British Journal of Cancer* 93, 1053–1056.

⁴⁸ Ludwig M. (2009) "Are adverse outcomes associated with assisted reproduction related to the technology or couples' subfertility?" *Nature Clinical Practice Urology*, 6, 8-16.

⁴⁹ Källén, B., Finnström, O., Karl-Gösta, N., Otterblad Olausson, P. (2005) "In vitro fertilization in Sweden: child morbidity including cancer risk" *Fertil Steril*, 84, 605–610.

⁵⁰ Knoester, M., Helmerhorst, F.M., Vandembroucke, J.P., Lucette van der Westerlaken, A. J., Walther, F.J., Veen, S. (2008) "Perinatal outcome, health, growth, and medical care utilization of 5- to 8-year-old intracytoplasmic sperm injection singletons". *Fertil Steril*, 89, 1133–1146; Cetinkaya, F. Gelen, S.A., Kervancioglu, Oral, E.E. (2009) "Prevalence of asthma and other allergic diseases in children born after in vitro fertilisation" *Allergo et Immunopathol.* 37, 11-13.

⁵¹ M. Ceelen, van Weissenbruch, M.M., Roos, J.C., Vermeiden, J.P. W., van Leeuwen, F.E., Delemarre-van de Waal, H.A. (2007) "Body Composition in Children and Adolescents Born after *in Vitro* Fertilization or Spontaneous Conception". *J Clin Endocrinol Metab* 92, 3417–3423.

⁵² Ceelen, M., van Weissenbruch M.M., Vermeiden, J.P. W. van Leeuwen, F. E., Delemarre-van de Waal, H.A. (2008) "Growth and development of children born after in vitro fertilization", *Fertil Steril*, 90, 1662–1673.

⁵³ Sun, Y., Vestergaard, M., Christensen, J., Zhu, J.L., Bech, B.H., Olsen, J. (2007) "Epilepsy and febrile seizures in children of treated and untreated subfertile couples". *Human Reproductio*, 22, 215–220.

⁵⁴ Ceelen, M., van Weissenbruch, M.M., Vermeiden, J.P.W., van Leeuwen, F.E., Delemarre-van de Waal, H.A. (2008) "Pubertal development in children and adolescents born after IVF and spontaneous conception". *Human Reproduction*. 23, 2791–2798.

⁵⁵ Yoon, G., Beischel, L.S., Johnson, J.P., Jones, M.C. (2005) "Dizygotic twin pregnancy conceived with assisted reproductive technology associated with chromosomal anomaly, imprinting disorder, and monochorionic placentation" *J Pediatr*, 146, 565-567; Tang, Y., Ma, C.X., Cui, W., Chang, V., Ariet, M., Morse, S.B., Resnick, M.B., Roth, J. (2006) "The risk of birth defects in multiple births: a population-based study". *Matern Child Health J*, 10, 75–81; Li, S.J., Ford, N., Meister, K., Bodurtha, J. (2003) "Increased risk of birth defects among children from multiple births". *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 67, 879–885; Allen, C., Bowdin, S., Harrison, R., Sutcliffe, F., Brueton, A.G., Kirby, L., Kirkman-Brown, G., Barrett, J., Reardon, C., Maher W. (2008) "Pregnancy and perinatal outcomes after assisted reproduction: a comparative study" *Ir. J. Med. Sci.*, 177, 233–241.

⁵⁶ Lidegaard, Ø., Pinborg, A., Andersen, A.N. (2005) "Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study" *Human Reproduction*, 20, 950–954.

⁵⁷ Karpman, E., Williams, D.H., Lipshultz, L.I. (2006) "IVF and ICSI in Male Infertility: Update on Outcomes, Risks, and Costs". *Asian J Androl*, 8, 643–673; Mandavilli A. (2008) "As IVF becomes more common, some concerns remain" *Nature Medicine* 14, 1171.

⁵⁸ Bonduelle, M. (2004) "Paediatric outcome following infertility management/genetic outcome" *International Congress Series*, 1266, 343–350.

⁵⁹ "The need for interaction between assisted reproduction technology and genetics: recommendations of the European Societies of Human Genetics and Human Reproduction and Embryology". (2006) *Human Reproduction*, 21, 1971–1973.

⁶⁰ Klitzman, R., Zolovska, B., Folberth, W., Sauer, M.V., Chung, W., Appelbaum, P. (2008) "Preimplantation genetic diagnosis on in vitro fertilization clinic websites: presentations of risks, benefits and other information" *Fertil Steril* (en prensa).