



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Influencia de las técnicas de reproducción asistida sobre la salud de la descendencia

Daiana Esquier Galeano

Grau de Bioquímica

Año académico 2015-16

DNI del alumno: 45190455 D

Trabajo tutelado por Ana María Proenza Arenas
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud.

Se autoriza a la Universitat a influir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave del trabajo:

Impronta genómica, epigenética, fecundación in vitro, inyección intracitoplasmática, síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de Angelman, alteraciones cardiometabólicas.

Índice

Resumen:.....	3
Abstract:.....	3
Abreviaciones	3
1. Introducción	4
1.1. Técnicas de reproducción asistida: Definición	4
1.2. Tipos de TRA y protocolos usados	5
1.3. Desarrollo embrionario: etapas	11
1.4. Potenciales riesgos	12
1.5. Marco legislativo	12
2. Objetivo	12
3. Materiales y métodos	13
3.1. Materiales	13
3.2. Métodos	13
4. Resultados y discusión.	16
4.1. Alteraciones cromosómicas, epigenéticas y en la impronta genómica.....	17
4.2. Enfermedades cardiometabólicas y disfunción vascular	23
4.3. Alteraciones en el desarrollo embrionario	24
5. Conclusiones.....	25
Bibliografía.....	26

Resumen:

Con el aumento de casos de niños nacidos mediante TRA se hace necesaria la evaluación de los riesgos que estas mismas puedan suponer para la salud de la descendencia. La presente investigación bibliográfica recoge la información de 60 artículos obtenidos mediante las bases de datos de PubMed Health, PubMed y OMIM. Los resultados muestran que las TRA suponen un aumento del riesgo de que se den fallos en los mecanismos de impronta genómica, así como alteraciones en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Para concluir, existen evidencias que indican que los bebés nacidos mediante TRA parecen ser más susceptibles a padecer síndromes como el de Beckwith-Wiedemann (BWS) o el de Angelman (AS), así como patologías cardiometabólicas, disfunción vascular o afecciones como el síndrome de Goldenhar.

Abstract:

With the increasing cases of children born by means of ART, an assessment becomes necessary of the risks that these may pose to the health of the offspring. This bibliographic research collects information from 60 papers obtained through databases from PubMed Health, PubMed and OMIM. The results show that the ART may present an increased risk of errors in genomic imprinting mechanisms, as well as alterations in the early stages of the embryonic development. In conclusion, there is evidence that babies born by means of ART appear to be more susceptible to syndromes such as Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) or Angelman syndrome (AS) as well as cardiometabolic diseases, vascular dysfunction or Goldenhar syndrome.

Abreviaciones

RMA: reproducción médicamente asistida.
TRA: técnicas de reproducción asistida.
OMS: organización mundial de la salud.
IA: inseminación artificial.
FIV: fecundación in vitro.
FSH: hormona estimulante del folículo.
HMG: gonadotropina menopáusica humana.
GnRH: hormona liberadora de gonadotropina.
hCG: gonadotropina coriónica humana.
ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoide.
LH: hormona luteinizante.
SNC: sistema nervioso central.
BWS: síndrome de Beckwith-Wiedemann.
AS: síndrome de Angelman.
PWS: síndrome de Prader-Willi.
SRS: síndrome de Silver-Russell.
UPD: disomía Uniparental.
DMRs: regiones de metilación diferencial.
OAVS: espectro óculo-aurículo-vertebral.

1. Introducción

1.1. Técnicas de reproducción asistida: Definición

Año tras año se ha visto un incremento en el número de parejas con problemas reproductivos, ya sea por patologías que afectan a los órganos reproductores, la edad de la madre, o a factores ambientales que afectan al recuento y la calidad espermática del padre. Actualmente, según la Sociedad Española de Fertilidad, hay estudios epidemiológicos que constatan que la esterilidad afecta a un 15% de la población en edad reproductiva en los países occidentales (1). Hasta finales del siglo XX las parejas incapaces de concebir una nueva vida debían resignarse a alternativas como la adopción, sin embargo, desde el nacimiento de Louise Brown en 1978, considerado el primer “bebé probeta”(2), cambiaron totalmente las perspectivas de los problemas reproductivos. Tras esto, la reproducción asistida ha supuesto para muchas parejas, una alternativa médica ante las dificultades para concebir hijos. Las técnicas de reproducción asistida (TRA) también son muy utilizadas por enfermos de cáncer que han de someterse a tratamientos agresivos como la radiación o la quimioterapia, en ese caso se les extraen los gametos antes de someterse a dicho tratamiento, conservando las muestras para posibilitar futuros embarazos.

Las técnicas de reproducción asistida se engloban dentro de la reproducción médicamente asistida (RMA). Tras una estandarización de todas las definiciones y los procedimientos realizados en las distintas regiones y países, la Organización mundial de la salud (OMS) define las TRA como *“Todos los tratamientos o procedimientos que incluyen la manipulación tanto de ovocitos como de espermatozoides o embriones humanos para el establecimiento de un embarazo. Esto incluye, pero no está limitado sólo a, la fecundación in vitro y la transferencia de embriones, la transferencia intratubárica de gametos, la transferencia intratubárica de cigotos, la transferencia intratubárica de embriones, la criopreservación de ovocitos y embriones, la donación de ovocitos y embriones, y el útero subrogado. Las TRA no incluye inseminación asistida (inseminación artificial) usando espermatozoides ni de la pareja ni de un donante”* (3).

Según un estudio publicado en 2012, las TRA tienen una tasa de éxito similar a las de reproducción natural; por otro lado, el éxito de las TRA, también depende de otros

factores como la edad de la madre, puesto que la tasa de éxito es mayor en madres jóvenes (4). Actualmente las TRA han experimentado un gran avance en cuanto a su tecnología y a sus protocolos. En principio esta alternativa a la reproducción natural se emplea cuando se halla una alteración tanto a nivel de tracto reproductor femenino como masculino, o dificultades en la interacción entre ambos. Por otro, lado también se recomiendan en el caso de que haya antecedentes de enfermedades genéticas que el embrión pudiera heredar y que, mediante el diagnóstico preimplantacional, se puede evitar seleccionando los embriones sanos para ser transferidos (5).

1.2. Tipos de TRA y protocolos usados

Los protocolos a utilizar dependen en gran parte de los factores causantes de la incapacidad reproductiva natural y de la TRA a realizar en cada caso específico, aunque están bastante estandarizados. Existen diversos factores implicados en la esterilidad reproductiva, aunque los más comunes según la Sociedad española de fertilidad son: factor masculino (25-35%), que engloba diversas alteraciones seminales, factor tubárico y peritoneal (17-20%), que engloba alteraciones estructurales y/o funcionales de las trompas de Falopio y su entorno, endometriosis (5-15%), que conforma una alteración en la función ovárica y tubárica, factor ovulatorio (25%), esterilidad inexplicada (20%) y esterilidad mixta (20-60%)(1).

Así pues existen diferentes técnicas de reproducción asistida, dependiendo de la metodología a seguir. La inseminación artificial (IA) no será explicada puesto que la OMS no la considera un TRA.

1.2.1. Fecundación *in vitro* (FIV)

El proceso de FIV da comienzo con la inducción de la ovulación gracias a una serie de medicamentos, con el objetivo de producir y madurar los óvulos que se encuentran en el ovario. Es importante que durante este proceso se lleve a cabo un control riguroso de la respuesta de la madre ante estos medicamentos. Tras la inducción de la ovulación se procede a la estimulación ovárica, nuevamente gracias a fármacos, con la finalidad de conseguir que los folículos maduren y se liberen los óvulos. Una vez se obtengan óvulos maduros se procede a su extracción. En posesión de óvulos viables y maduros se realiza la fertilización del óvulo y la incubación asistida selectiva. Una vez seleccionados los

embriones viables se procede a su transferencia. Normalmente tras la implantación se administran una serie de fármacos que aseguren o promuevan la implantación eficiente del embrión en las paredes uterinas, además del crecimiento temprano del embrión. En determinadas circunstancias se valora si este último paso es necesario, ya que dependerá de las condiciones en las que se encuentre la madre (6).

Es importante que todas las candidatas que deseen someterse a dicho tratamiento pasen por una serie de pruebas exhaustivas de fertilidad con tal de poder ajustar y personalizar al máximo las dosis y tipos de medicamentos utilizados (6,7). A continuación se explica de una forma más detallada los diferentes pasos del procedimiento antes mencionado.

- **Estimulación ovárica:** dicho proceso requiere de un aporte farmacológico que podría tener, en algunos casos, repercusiones negativas para la salud de la madre. Debido a ellos antes de recurrir a ellos, es apropiado asegurarse de que es imposible aprovechar el ciclo de ovulación natural de la madre. Si dicha situación no fuera posible se recurriría a la estimulación ovárica vía medicamentos tales como la Clomifeno (ver figura 1), gonadotropinas como la Hormona estimulante del folículo (FSH) o la gonadotropina menopáusica humana (HMG) (ver figura 1); otra opción son los análogos (agonistas y antagonistas) de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), como el Procrin o el Cetrotide respectivamente. El proceso depende en gran medida del fármaco que se utilice, así como de su concentración (7,8).

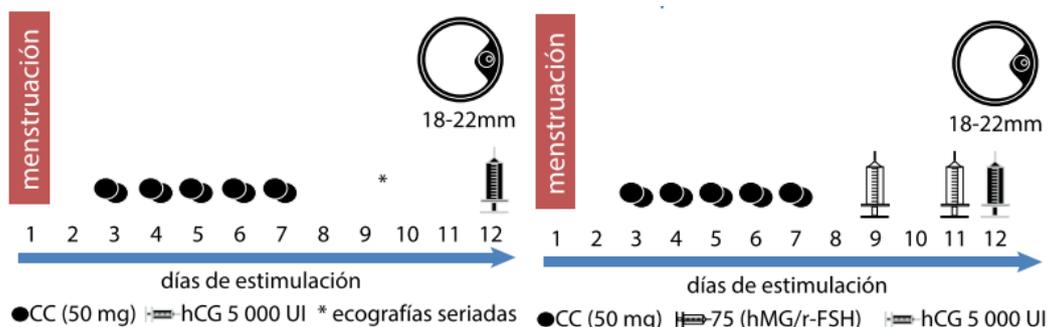


Figura 1. En la figura de la izquierda se observa la inducción de la ovulación con Citrato de Clomifeno. En la figura de la derecha se observa la inducción de la ovulación mediante gonadotropinas. Recuperado de Escudero Velando (2012) (8).

Durante el proceso es necesaria una monitorización, con tal de optimizar el ciclo y la coordinación de la maduración del folículo y el número de óvulos.

Además, también es de vital importancia a la hora de detectar posibles efectos adversos de la medicación, como puede ser el síndrome de hiperestimulación ovárica. Dichos controles normalmente se realizan mediante ecografías para controlar el desarrollo folicular, acompañados de la determinación de los niveles séricos de estradiol (7).

- **Maduración folicular con Gonadotropina coriónica humana (hCG):** la recogida de los óvulos depende de la maduración folicular, dicha maduración será inducida mediante un tratamiento estandarizado con hCG que limita el pico de hormona luteinizante (LH) (7,9).
- **Punción folicular:** hasta ahora el método más fiable y seguro para obtener los óvulos es la punción folicular transvaginal mediante guía ecográfica. Durante este proceso debe realizarse una sedación intravenosa de la paciente, además de realizarse una monitorización de las constantes vitales por un especialista (7).
- **Fecundación del ovocito:** para que la fecundación pueda realizarse, el ovocito ha de haber concluido su crecimiento y su maduración tanto nuclear como citoplasmática de una manera eficiente y coordinada, esto es importante puesto que alteraciones o asincronías pueden derivar en anomalías morfológicas. Es importante aclarar que solo serán fecundados aquellos ovocitos que se encuentren en metafase II, es decir, en aquellos en los cuales ya se haya dado la expulsión del primer corpúsculo polar (7,9).

Los ovocitos se colocan en un medio adecuado, capaz de responder a las necesidades metabólicas del embrión en cada momento evolutivo. Normalmente se acepta el piruvato y el lactato como fuentes de energía en las primeras fases del desarrollo, ya que el consumo de glucosa al principio es muy bajo, pero va aumentando conforme aumenta el número de células. Existen dos tipos de medios de cultivo utilizados según el volumen: microgotas (20-30 µl) sobre una placa de cultivo y recubiertas con aceite mineral, y pocillos con un volumen de 0,5-1 ml. A continuación, se añade una concentración adecuada de espermatozoides móviles, previamente seleccionados, la placa donde se encuentran los ovocitos. Es importante que el número de espermatozoides sea igual o superior a 20.000 por ovocito, y que hayan sido capacitados mediante las técnicas de *Swim-up* y gradiente espermático (7,10).

Tras la inseminación se recomienda un tiempo de incubación entre 2-5 días antes de realizar la implantación. Los preembriones que serán transferidos se seleccionan mediante un estudio de su calidad, según los Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocitos Humanos descritos en el consenso ASEBIR. Los parámetros que permiten valorar la calidad embrionaria son: el número de células, fragmentación, velocidad de división, multinucleación, tamaño y simetría de los blastómeros, además del aspecto de la zona pelúcida y del citoplasma (7).

- **Transferencia embrionaria:** una vez se ha realizada la fecundación del ovocito, el embrión resultante ha de ser implantado en el útero materno. La metodología más eficaz consiste en una transferencia ecoguiada a través del canal cervical mediante un catéter. Normalmente la transferencia se realiza cuando el embrión se encuentra en fase de blastómero o blastocisto, y es importante tener en cuenta el grosor del endometrio, puesto que la eficiencia de la implantación aumenta si aproximadamente de 8 mm (7).
- **Soporte farmacológico en fase lútea:** Se basa en la administración de hCG vía intramuscular o de progesterona ya sea por vía oral, intramuscular o vaginal. Dicho soporte se proporciona de forma secuencial desde la punción folicular (7,9). Se realiza solo en los casos necesarios.

1.2.2. Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI)

En el caso de la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), existe una variación en el protocolo que afecta a la etapa de fecundación del ovocito. Los pasos previos a la fecundación del ovocito y la capacitación de los espermatozoides, son idénticos al caso de FIV. En este caso de la ICSI, una vez extraído el ovocito, éste precisa un proceso de preparación que consiste en la eliminación de las células de la granulosa o desnudado. Este paso es necesario para la correcta valoración del ovocito en cuanto a su maduración tanto nuclear como citoplasmática, así como para comprobar la ausencia de anomalías, etc. Este paso es determinante para el éxito de la técnica puesto que, como ya se ha mencionado solo se podrán utilizar los ovocitos que se encuentren en metafase II (7,9).

Para eliminar las células de la granulosa se somete al ovocito a un proceso, que no debe superar los 8 minutos, compuesto por dos fases: la primera se considera la fase enzimática, puesto que consiste en someter al ovocito a una concentración de 80 UI/ml de hialuronidasa durante 30 segundos, tras esto se lava y se procede con la siguiente fase. La segunda fase, considerada mecánica, supone el paso de los ovocitos a través de una punta de pipeta de unos 150-250 μm (7). A la hora de aplicar la técnica ambas fases se dan de forma casi simultánea.

Tras esto se han de realizar dos procesos casi en paralelo. Una vez se haya seleccionado el ovocito a fecundar, se sujeta el ovocito con una pipeta *holding* (ver figura 2), de tal manera que, al ejercer una pequeña presión negativa sobre él se produzca un efecto ventosa que permita inmovilizarlo. Por otro lado se lleva a cabo la inmovilización y aspiración del espermatozoide seleccionado. Este último paso se realiza colocando la muestra espermática dentro de un medio con Polivinil pirrolidona al 8% o a hialuronato, puesto que estos compuestos reducen la movilidad espermática facilitando su aspiración e inmovilización (7).

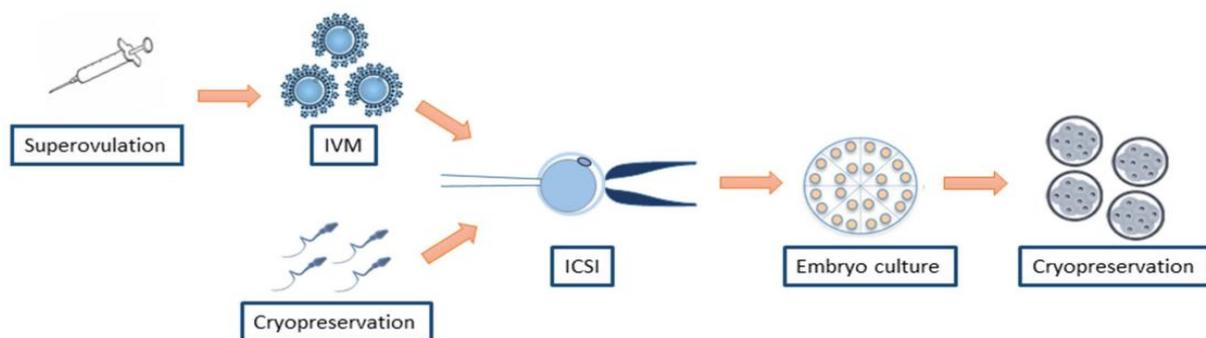


Figura 2. Esquema del procedimiento seguido en la técnica ICSI, en el caso de que no se produzca la transferencia del embrión a la madre, se criopreservan los embriones. Se obtienen ovocitos por estimulación ovárica, se desnudan y se realiza la ICSI. Posteriormente se cultiva el embrión o se criopreserva. Recuperado de Sánchez-Calabuig *et al.* (2014) (11)

Una vez se tiene el ovocito y el espermatozoide inmovilizado se procede a la inyección del espermatozoide dentro del ovocito. Dicha inyección se ha de realizar evitando la zona del corpúsculo polar. Durante este paso se procede a la rotura del oolema, permitiendo el contacto entre los factores ooplásmicos y los espermáticos (7,11).

Tras comprobar que la rotura de la membrana plasmática se ha dado de una manera correcta se procede a depositar el espermatozoide en una zona distal al punto de inyección. Este último paso es de vital importancia, puesto que la viabilidad y buen

desarrollo del embrión dependen de él (7). El proceso de incubación del embrión, al igual que su posterior selección y transferencia se lleva a cabo mediante el mismo protocolo mencionado en la FIV.

Como se puede observar en la figura 3, la FIV y la ICSI se diferencian la una de la otra debido a que en la ICSI el espermatozoide es depositado dentro del ovocito, además del paso de desnudado propio de la misma técnica. Por lo demás la metodología se desarrolla siguiendo los mismos pasos. Es importante mencionar que la gran diferencia entre las TRA y la reproducción natural reside en el medio en el cual se encuentra el ovocito, y el posterior preembrión durante la fecundación y las primeras fases de su desarrollo (ver figura 3). Sin embargo, las técnicas *in vitro* intentan imitar con la mayor exactitud las condiciones del útero maternas vigilando parámetros como la temperatura, la humedad y la luz.

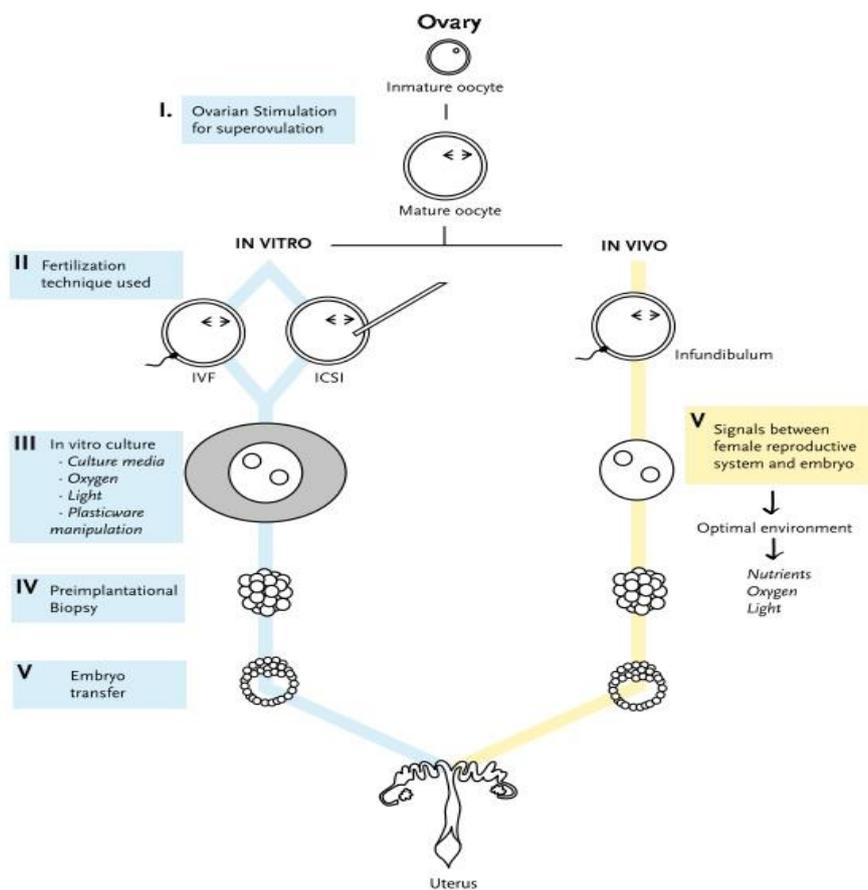


Figura 3. Esquema comparativo del procedimiento seguido en las técnicas *in vitro* vs *in vivo*. *In vitro*: (I) estimulación ovárica con la finalidad de obtener ovocitos; (II) técnicas de FIV o ICSI para la inseminación; (III) condiciones a tener en cuenta respecto al medio de cultivo de los embriones; (IV) selección preimplantacional de los embriones más viables; (V) transferencia embrionaria. *In vivo*: (V) señalización recíproca entre el embrión y la madre tras la fecundación del ovocito. Recuperado de Ventura-Juncá *et al.* (2015) (10)

1.3. Desarrollo embrionario: etapas

El desarrollo embrionario es un proceso complejo y delicado que requiere de la máxima coordinación y precisión. Comienza con la fecundación del óvulo, y desde ese punto cualquier alteración que se pueda dar en el ambiente que lo rodea puede alterar el equilibrio que este proceso requiere. Se define fecundación como la fusión entre el gameto femenino y el masculino, de esta manera se estimula al cigoto a comenzar el desarrollo. Las diversas etapas del desarrollo que transcurren entre la fecundación y el nacimiento, constituyen la embriogénesis. La mayoría de los patrones de embriogénesis constan principalmente de cinco etapas (12).

La primera etapa sucede inmediatamente tras la fecundación, en la cual se da la segmentación. Durante dicha etapa el inmenso volumen de citoplasma del cigoto se divide en blastómeros, este proceso requiere de una serie de divisiones mitóticas extremadamente rápidas. Al final de esta etapa el cigoto se encuentra en estado de blástula (12,13).

Tras el cese de las divisiones meióticas da comienzo la segunda fase, en la cual los blastómeros comienzan a variar sus posiciones unos respecto de los otros, produciéndose reorganizaciones celulares. En este punto se está llevando a cabo la gastrulación, proceso mediante el cual se obtienen las tres capas germinales que constituyen al embrión en estado de gástrula: el ectodermo, el endodermo y el mesodermo. Una vez establecidas las tres capas germinales da comienzo la tercera fase, la organogénesis. Muchos órganos contienen células de más de una capa germinal (13). Por tanto, cualquier alteración que se pueda producir durante estas etapas tendrá serias repercusiones en el individuo resultante.

En la cuarta fase, de una forma casi paralela se da la separación de las células germinales respecto de las somáticas. Las células somáticas darán lugar al cuerpo del individuo, mientras que las células germinales serán las precursoras de los gametos, interviniendo en la formación de una nueva generación. Aun así, el proceso de gametogénesis no concluye hasta que el organismo ha llegado a la madurez física (12). En el caso de los humanos la última fase consiste en el nacimiento, pero cabe especificar que el desarrollo continúa hasta la muerte del individuo, puesto que a lo largo de su vida se producirán toda una serie de transformaciones fisiológicas y metabólicas que contribuirán a que el desarrollo continúe hasta la muerte.

1.4. Potenciales riesgos

Aunque se trate de una técnica ligeramente invasiva para la madre a nivel quirúrgico, los procesos de estimulación ovárica y de preparación del endometrio podrían suponer una alteración fisiológica, que si no se regulan correctamente puede dar lugar a alguna patología. Las complicaciones y los riesgos que se observan con mayor frecuencia son: el síndrome de estimulación ovárica, embarazo ectópico, aborto espontáneo, embarazo múltiple, posibles complicaciones asociadas a la edad materna, riesgo de transmisión de anomalías cromosómicas o aneuploidías, riesgos psicológicos, etc. (14)

1.5. Marco legislativo

Según la ley Española publicada en el BOE núm. 126, de 27/05/2006, con referencia BOE-A-2006-9292, queda estipulado que:

Según el capítulo I, artículo 3, las TRA *“se realizarán solo cuando haya altas probabilidades de éxito, y no supongan graves riesgos en lo que concierne a la salud física o psíquica de la mujer o su descendencia”*. Por otro lado, *“en el caso de la FIV o técnicas similares, solo se autoriza la transferencia de un máximo de tres preembriones en cada mujer en cada ciclo reproductivo”*. Todo esto requiere de una completa información previa a todos los participantes, tanto las mujeres como los donantes.

Por supuesto, según el artículo 4 la práctica de las TRA *“solo se podrá llevar a cabo en centros debidamente autorizados para ello por la autoridad sanitaria correspondiente”*.

2. Objetivo

Una vez contextualizado el tema a tratar, se expone el objetivo del trabajo, el cual consiste en realizar una revisión bibliográfica con el fin de hallar la existencia de posibles riesgos que las TRA puedan suponer, a largo plazo, para la salud de las criaturas nacidas gracias a las mismas. De cara a la investigación se parte del siguiente supuesto:

Es evidente que estas técnicas se proponen imitar de la forma más exacta posible el proceso de fecundación y reproducción natural, pero el hecho de tener que manipular los gametos fuera del cuerpo humano podría suponer un estrés para los mismos. Es posible que el estrés acumulado por estos gametos durante la manipulación, el estado y

la calidad de la muestra espermática, los óvulos obtenidos, el ambiente en el cual se realice la incubación del embrión o el entorno hormonal al cual esté sometido durante cualquier punto del proceso pueda verse reflejado en algún tipo de anomalía.

3. Materiales y métodos

Este trabajo bibliográfico se ha realizado de acuerdo con las recomendaciones de *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)* (15).

3.1. Materiales

Para la llevar a cabo la investigación se ha realizado una búsqueda sistemática de literatura en la base de datos *The National Center for Biotechnology Information*, haciendo uso de los motores de búsqueda: *Pubmed*, *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)* y *PubMed Health*. Por otro lado, se han consultado datos estadísticos concretos de la OMS y la Sociedad Española de Fertilidad.

3.2. Métodos

Debido al extenso número de resultados obtenidos en las búsquedas, ha sido necesario acotarlos y seleccionarlos mediante los siguientes filtros: *Article type "Systematic reviews"*, *Text availability "Free Full text"* y *Publication dates "5 last years"*. Por otro lado, también se acotó con el término *[Title]* en algunos casos, con el fin de seleccionar solo aquellos artículos que tuvieran las palabras clave en el título del artículo, tal y como se dispone en la tabla 1.

3.2.1. Palabras clave

Se ha realizado la búsqueda bibliográfica utilizando las siguientes palabras clave: "Risk of ARTs defects", "Risk of ARTs defects", "Imprinting disorders in ARTs", "Metabolism disease in ART children", "Metabolism disorders in ART children", "Congenital malformations in assisted reproduction technology", "Assisted reproductive technology and birth defects" y "Histone methylation and assisted reproductive technology", tal y como queda reflejado en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de las páginas webs consultadas, así como los filtros y las palabras claves utilizadas para acotar los resultados. Además se presenta en número de artículos seleccionados en cada caso.

<i>Motor de búsqueda</i>	<i>Palabras clave</i>	<i>Filtros</i>	<i>Resultados</i>	<i>Seleccionados</i>
<i>Pubmed Health</i>	<i>risk of ARTs defects</i>	<i>systematic reviews</i>	95	3
<i>Pubmed - OMIM</i>	<i>Assisted reproductive technologies</i>		4	3
<i>Pubmed</i>	<i>imprinting disorders in ARTs</i>	<i>Free full text</i>	49	13
<i>Pubmed</i>	<i>metabolism disease in ART children</i>	<i>Free full text, últimos 5 años</i>	39	1
<i>Pubmed</i>	<i>metabolism disorders in ART children</i>	<i>Free full text</i>	49	3
<i>Pubmed</i>	<i>Congenital malformations in assisted reproduction technology</i>	<i>Free full text</i>	28	10
<i>Pubmed</i>	<i>assisted reproductive technology and birth defects</i>	<i>[Title]</i>	59	22
<i>Pubmed</i>	<i>congenital malformations in assisted reproduction technology</i>	<i>Free full text, últimos 5 años.</i>	21	5

3.2.2. Criterios de selección

A la hora de escoger los artículos se han valorado los títulos y los *abstracts*, en especial los objetivos, los resultados y discusión. Se han escogido aquellos que incluían las palabras clave, aquellos que realizaban estudios comparativos entre grupos control y grupos

nacidos por ART, aquellos que realizaban comparaciones entre las metodologías de las ART y aquellos que daban información concluyente sobre patologías o alteraciones epigenéticas e impronta genómica. Se han excluido aquellos cuyos resultados eran inconcluyentes o cuya información era redundante.

Selección de los estudios. Tras las diferentes búsquedas realizadas se obtuvieron 344 resultados. Aplicando los criterios de inclusión y exclusión de se han seleccionado para el estudio 61 tal y como se observa en la figura 4.

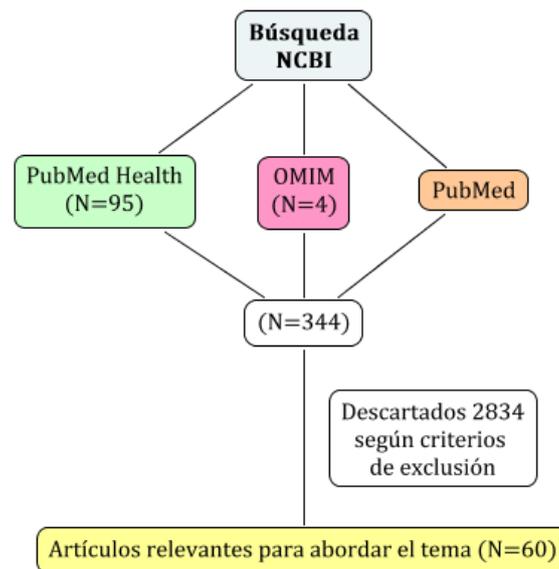


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso de selección de artículos.

3.2.3. Codificación de estudios

Se ha realizado una codificación de los artículos según su temática con la finalidad de llevar una organización de la información y de poder agrupar aquellos artículos cuya información es complementaria. La finalidad de esta agrupación es presentar todos los artículos seleccionados de una forma ordenada. **ART y defectos en el nacimiento** (16–32); **Enfermedades cardiovasculares** (33–36); **Alteraciones cromosómicas, epigenéticas y en la impronta genómica** (37–53); **Riesgos relacionados con la metodología** (11,37,44,47,54–65); **Desarrollo embrionario** (66–69).

4. Resultados y discusión.

A lo largo de los años incrementa el número de concepciones mediante TRA (31), en 2011 en España entre 1,2-2,1% de los nacimientos fueron mediante TRA (70). Esta situación ha llevado a la sociedad científica a valorar los posibles riesgos que este tipo de técnicas puedan acarrear. Se han realizado numerosos estudios al respecto, alguno de ellos han determinado que las TRA suponen un riesgo mayor para la salud de la descendencia (19,21), ya que éste aumenta en un 30-40% respecto a la concepción natural (29). Por tanto, ciertos estudios defienden que, en lo que respecta a la salud del individuo resultante, las TRA podrían ser un factor de riesgo importante de cara a diversas patologías (26,32). Sin embargo, no todos los investigadores están de acuerdo en dicha afirmación, opinando que las TRA no suponen un aumento en el riesgo de anomalías cromosómicas, otorgando este riesgo a la avanzada edad materna (42).

Cabe destacar que es complicado realizar un análisis de estas patologías y su relación con las TRA debido a que la mayoría de estudios presentan problemas metodológicos o no realizan una agrupación adecuada de los grupos poblaciones ni de los grupos control (30).

Se ha observado que el riesgo que las mismas podrían suponer podría provenir a diversas fuentes como: el procedimiento *in vitro*, los fármacos utilizados en la estimulación folicular y la obtención del ovocito, el medio de cultivo de los embriones, el estrés que pueda sufrir el embrión en las etapas preimplantacionales, tratamientos de fertilidad, etc. (21,30,32). Se han realizado estudios que no han encontrado diferencias significativas en el riesgo que suponen para la salud del neonato, entre FIV e ICSI (28,66). Otras investigaciones como la de Yan y colaboradores (2011) (24), tampoco obtuvieron resultados significativos como para afirmar que haya alguna diferencia entre ambas técnicas, tal como expresa en su trabajo tras el análisis de 15.405 niños nacidos mediante TRA del 2004 al 2008. Como se observa, existen datos contradictorios a la hora de valorar el riesgo que las TRA suponen.

Dentro de esta investigación se ha procurado contar con artículos que tengan en cuenta la edad de la madre a la hora de realizar el análisis de riesgos, ya que se ha visto que cuanto mayor es la edad de la madre, mayor es el riesgo de malformaciones congénitas (18). Es importante tener en cuenta este factor para poder diferenciar el riesgo intrínseco a la edad de la madre que reportan las TRA en sí. Del mismo modo, se han

tenido en cuenta los posibles antecedentes familiares de enfermedades genéticas hereditarias, malformaciones, potenciales patologías, además de la calidad de la muestra espermática como un factor de riesgo añadido no vinculado a la metodología de las TRA

Aunque se hayan encontrado estudios contradictorios en cuanto al riesgo que las TRA suponen a nivel general, varios autores defienden que los procedimientos involucrados dentro de los métodos de reproducción humana asistida, podrían incrementar el riesgo de complicaciones y malformaciones, con respecto a la reproducción natural. Diversos estudios han dejado constancia del incremento en las malformaciones congénitas en niños nacidos por TRA (19,20,23,29). Dichas opiniones podrían respaldarse con los estudios realizados en Suecia donde se observó un incremento del 5,4% de malformaciones y defectos en el sistema nervioso central (SNC) como: hidrocefalia, anencefalia o espina bífida en bebés nacidos mediante FIV (27). En Australia occidental un 9% de los niños nacidos mediante FIV y un 8,6% nacido mediante ICSI presentaron defectos congénitos (20,23,27). Actualmente dentro de estas malformaciones y/o defectos en el desarrollo se encuentran una serie de síndromes y enfermedades asociadas con errores en la impronta genómica como son: Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), síndrome de Angelman (AS), síndrome de Prader-willy (PWS), síndrome Silver-Russell (SRS), retinoblastoma, etc. (28). Por otro lado, también se han datado enfermedades cardiometabólicas (35), disfunción vascular (34,36), predisposición a la diabetes (17), riesgo de blastogénesis (68), etc. El riesgo de dichas enfermedades no parece estar relacionado con los múltiples embarazos, es decir, que no existe una diferencia significativa entre embarazos múltiples y no múltiples (25).

4.1. Alteraciones cromosómicas, epigenéticas y en la impronta genómica

Los tratamientos de fertilidad y metodología de las TRA son complejos y poseen muchos puntos críticos que podrían someter al preembrión a toda una serie de factores lesivos que podrían alterar la dotación genética del embrión resultante (38,40,41,43-45).

Según la bibliografía consultada, una gran parte de las patologías son producidas por fallos en la impronta genómica. Se define impronta genómica como un mecanismo de regulación génica mediante el cual se da un comportamiento distinto de cada alelo en función de su origen parental. Esto se traduce en que algunos genes tendrán una expresión diferencial según el sexo del progenitor del cual han sido heredados (12,71).

En las células germinales primordiales el DNA está prácticamente sin metilar, pero al desarrollarse en óvulo o espermatozoide se recupera el patrón de metilación que puede heredarse o puede sufrir ciertas alteraciones. Así pues, el gen heredado ya sea paterno o materno, trae consigo marcas de metilación que determinan su expresión, se dice que estos genes están marcados o “improntados”. A este fenómeno se conoce por impronta genómica. La impronta genómica añade información relevante al genoma que se ha heredado, dichas marcas pueden o no regular los patrones temporales y espaciales de expresión de un gen (12,51,71). Por tanto, la impronta genómica juega un papel muy importante en el crecimiento embrionario, la función placentaria y el desarrollo neurológico. Dicha expresión monoalélica depende de: mecanismos epigenéticos tales como la metilación de dinucleótidos CpG en ciertas regiones de metilación diferencial (DMRs), cuya función es actuar como centro de control de la impronta, así como de mecanismos genéticos (Ver tabla 2). Alteraciones en la impronta pueden dar lugar a la expresión aberrante de ciertos genes y por ello se relacionan estos errores a la aparición de enfermedades congénitas, síndromes y tumores malignos (39,48).

Tabla 2. Tabla resumen de los mecanismos responsables de alteraciones en la impronta genética. Recuperado de (Amor y Halliday 2008) (48).

Factores	
Genéticos	Se produce la delección o duplicación de regiones del genoma que contienen genes improntados. Mutaciones en el DNA de genes que normalmente estas marcados o de sus regiones reguladoras. Disomía uniparental (UPD)
Epigenéticos	Cambios en la metilación del DNA y/o modificaciones en las histonas (epimutaciones).

4.1.1. Mecanismos causantes de defectos en la impronta en TRA.

Ahora bien, la relación entre las TRA y dichas alteraciones ha sido complicada de explicar, debido a que se han de tener en cuenta diversos factores. De hecho, actualmente no se sabe exactamente que paso o pasos asocian las TRA con dichos defectos, lo que sí es muy probable, es que el entorno *in vitro* al que se somete a los gametos y los embriones tenga

un papel relevante (51). Lo más probable, es que la introducción de estos errores genéticos sea debida a los siguientes factores.

En primer lugar cabe mencionar que las TRA como FIV e ICSI se saltan la barrera que la selección natural ha impuesto con la finalidad de evitar la fertilización de gametos anormales (ver figura 5)(11,50). Cabe mencionar que las clínicas que realizan dichos procedimientos se aseguran de someter a los espermatozoides a una selección y cribado mediante técnicas como el Swim-up y el gradiente espermático, con tal de asegurar la selección de los mejores y de reproducir de alguna manera la selección que se da en el tracto reproductor femenino. (51)

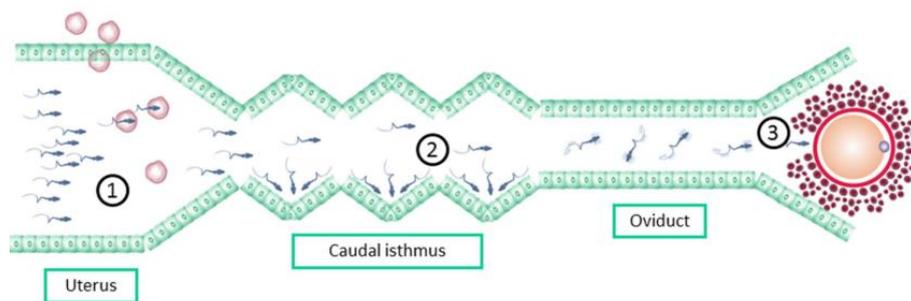


Figura 5. Imagen ilustrativa de las barreras naturales de selección de espermatozoides viables que no se dan en la técnica ICSI: (1) microambiente del tracto reproductor femenino, incluidas las células inmunitarias; (2) interacción entre el espermatozoide y el istmo caudal; (3) interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida. Recuperado de Sánchez-Calabuig *et al.* (2014) (11).

Por otro lado, la manipulación *in vitro* del oocito tiene un alto riesgo, puesto que en el caso de la ICSI es necesario la eliminación de las células de la granulosa, que abre la puerta a la posibilidad de que haya una impronta genómica defectuosa. Este riesgo se debe a que dicho complejo se encarga de mantener al oocito en un estado de secuestro meiótico. Por otro lado, en el caso de la ICSI el hecho de introducir el acrosoma espermático y los enzimas digestivos directamente dentro del ooplasma altera completamente los mecanismos de homeostasis celular (45), así como las estructuras intracelulares. Sin embargo, el hecho de que los defectos en la impronta se den tanto en las técnicas de FIV con o sin ICSI sugiere que los factores etiológicos sería aquellos pasos que estas dos técnicas tienen en común (39,45,50,51).

Otro factor a tener en cuenta es las condiciones *in vitro* en las que se manipula el ovocito y el embrión, ellos repercute de una manera directa puesto que aunque se

intenten imitar de la forma más exacta posible las condiciones uterinas materna, controlando la temperatura, humedad, luz, etc. el riesgo intrínseco que posee la manipulación *in vitro* en lo que refiere a la disrupción de la impronta genómica existe (37-39,46). Tal y como muestra el trabajo llevado a cabo por de Waal y colaboradores (2014) donde se observó, mediante un estudio realizado en embiones de ratón, que las condiciones de cultivo *in vitro* incrementan la frecuencia de errores epigenéticos en la impronta de algunos genes del tejido placentario (40).

El tratamiento farmacológico utilizado para la estimulación ovárica también es un factor a tener en cuenta (39,51). Se disponen de estudios como el de Market-Velker y colaboradores (2010), en el cual se observó que la superovulación podría tener efectos negativos durante la ovogénesis, por un lado interrumpiendo la transmisión de la impronta genómica en los ovocitos en crecimiento; y por otro lado causando la disrupción del efecto de determinados genes maternos que, posteriormente, serán necesarios para mantener la correcta transmisión de la impronta genómica durante el desarrollo embrionario y la implantación (47). Sin embargo, otros estudios realizados más tarde, parecen indicar que la metilación del DNA a nivel global no se ve alterada tras tratamientos de superovulación (44). Esto nos coloca de nuevo en una postura contradictoria, lo que lleva a pensar que no existen aún pruebas concluyentes para determinar que el tratamiento farmacológico suponga un mayor riesgo, aunque tampoco se puede descartar como factor de riesgo.

4.1.2. Síndromes relacionados con alteraciones en la impronta genómica.

Los desórdenes en la impronta genómica como BWS, AS, PWS o SRS son enfermedades raras, causadas por una UPD, duplicaciones, deleciones o metilación aberrante del DNA en regiones específicas (ver figura 6) (39).

Cabe destacar que estudios como el de Maher y colaboradores (2003) muestran que existe un aumento de la incidencia de dos desórdenes concretos (BWS y AS) en niños nacidos mediante las técnicas de TRA FIV y ICSI (53), por lo cual parece lógico pensar que los pasos que se den *in vitro* podrían ser un factor etiológico determinante en estos casos (38,40,45,46,48,50).

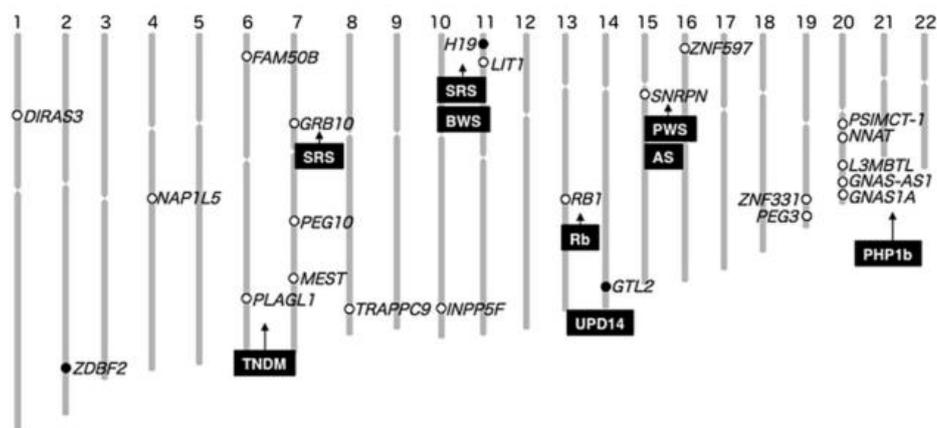


Figura 6. Mapa cromosómico humano en el cual se representan algunos de los desórdenes en la impronta genómica. Se representan 23 DMRs (3 paternos en negro y 20 maternos en blanco). Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), síndrome de Angelman (AS), síndrome de Prader-Willi (PWS), síndrome de Silver-Russell (SRS), retinoblastoma (RB), disomía uniparental en el cromosoma 14 (UPD14). Recuperado de Hiura *et al.* (2014) (39).

De hecho, en esos estudios se explica, que en los casos de BWS cuyas bases moleculares han sido identificadas, se halló una pérdida de la metilación en el alelo materno KvDMRI, situado en el cromosoma 11 (ver figuras 6 y 8) (53). En el caso del AS, se le atribuye como causa la pérdida de la metilación en SNRPN codificado en el alelo materno del cromosoma 15 (ver figuras 6 y 7) (49,53). El BWS tiene una incidencia de 1/3.372 en el caso de niños nacidos por TRA, mayor a la que se da de forma natural donde la incidencia es de 1/14.500 niños (49). Por otro lado, la frecuencia de AS es del 1,6% en el caso de nacidos mediante TRA (39), dicha recurrencia es ligeramente superior a la que se encuentra en la población normal (0,06%) (48).

Angelman Syndrome

A Clinical Synopsis

Severe developmental delay
 Severe speech impairment (usually <4 words)
 Ataxic gait and “abnormal movements” (“happy puppet syndrome”)
 Characteristic behaviour: frequent laughter, excitable personality
 Microcephaly frequent
 Epileptic seizures and characteristic EEG abnormalities
 Usually sporadic

B Molecular Genetic Findings

70% Deletion of maternal chromosome 15 (rarely a rearrangement)
 2% Uniparental (paternal) disomy chromosome 15
 5–10% Germline *UBE3A* Mutation
 2% Imprinting centre deletion
 3% Imprinting centre defect with no deletion

C Imprinted gene cluster at 15q11-13

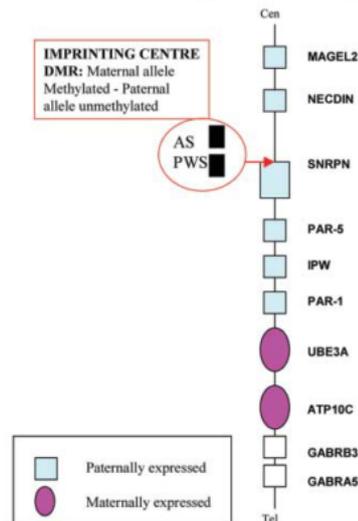


Figura 7. Base clínica y molecular del AS. (A) Resumen de las características fenotípicas. (B) Frecuencia de las anomalías genéticas en AS. (C) Mapa esquemático del cromosoma 15 en el cual se muestra la localización de centro de control de impronta/*SNRPN* DMR. Recuperado de Maher (2005) (52)

Beckwith-Wiedemann Syndrome

A Clinical Synopsis

Pre and/or postnatal overgrowth
 Macroglossia
 Anterior abdominal wall defect (e.g. exomphalos, umbilical hernia)
 Neonatal hypoglycaemia
 Organomegaly
 Embryonal tumours (~7% of patients)
 15% familial

B Molecular Genetic Findings

2% Paternal duplication or maternal rearrangement of chromosome 11p15.5
 20% Uniparental (paternal) disomy chromosome 11
 5% *CDKN1C* mutation (40% of familial cases)
 40% Imprinting centre 2 (IC2) defect (epimutation, loss of maternal methylation)
 5% Imprinting centre 1 (IC1) defect (gain of maternal methylation)
 1% Imprinting centre (IC1 or IC2) deletion

C Imprinted gene cluster at 11p15.5

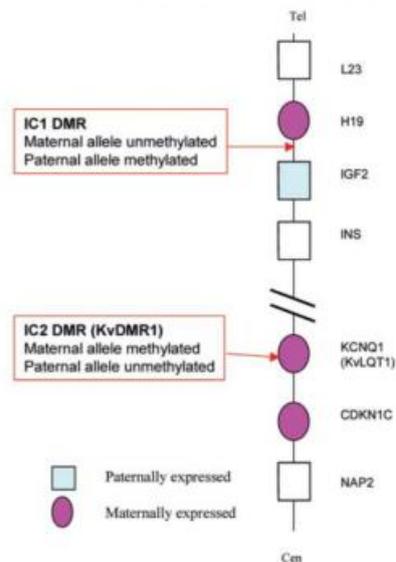


Figura 8. Base clínica y molecular de BWS. (A) Resumen de las características fenotípicas. (B) Frecuencia de las anomalías genéticas en BWS. (C) Mapa esquemático del cromosoma 11 en el cual se muestra la localización de los centros de impronta IC 1 e IC 2. Recuperado de Maher (2005)(52)

4.2. Enfermedades cardiometabólicas y disfunción vascular

En los últimos años diversos estudios epidemiológicos han mostrado que existe una relación entre ciertos eventos patológicos durante el desarrollo fetal y un incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Dichas conclusiones conformaron lo que se conoce como “hipótesis de la programación fetal de las enfermedades cardiovasculares” (34,35). Se ha observado que las TRA podrían estar relacionadas tanto directa como indirectamente con la disfunción vascular (36). Tal y como muestra el estudio de Yeung y Druschel (2013), las causas de las enfermedades cardiometabólicas y su relación con las TRA pueden ser debidas a diferentes factores: por un lado se piensa que la alteración de los mecanismos epigenéticos juega un rol importante; por otro lado, también se cree que la metodología de las TRA podría repercutir negativamente en el desarrollo embrionario (35).

En el caso concreto de la patología denominada Tetralogía de Fallot, se ha visto que las TRA, especialmente las que requieren de una FIV/ICSI aumentan el riesgo en un 30% de padecer dicha malformación en comparación a la reproducción natural donde se da en un 0,012% de los casos. Las TRA tienen un efecto adverso tanto directa como indirectamente; los riesgos directos son todos aquellos intrínsecos a la metodología, mientras que los indirectos son los asociados a embarazos múltiples (33).

En lo que se respecta a la disfunción vascular, modelos animales han mostrado como las TRA podrían estar dentro de los factores etiológicos de dicha afección. Se llegó a dicha conclusión a partir de un estudio que mostró como en ratones normales las TRA inducían una disfunción vascular en la descendencia, lo cual indica que la técnica *per se* es la principal culpable. Por otro lado, también se ha observado que dicha afección podría estar causada por el método de estimulación hormonal, ya que podría producir alteraciones epigenéticas y vasculares. De nuevo se incluyen las condiciones *in vitro* dentro de los factores etiológicos puesto que la concentración de metabolitos clave y/o factores de crecimiento que se consiguen en el medio de cultivo pueden no ser los mismos que se encuentren en los fluidos de los oviductos de forma natural. De esta forma las condiciones de cultivo subóptimas comprometen la capacidad del embrión de mantener la impronta genómica si se comparan con las condiciones *in vivo* (36).

Gkourogiani y colaboradores (2014) realizaron el estudio de ciertos parámetros bioquímicos en niños nacidos mediante TRA. Sus estudios mostraron que estos niños

presentaban concentraciones elevadas de T3, causada probablemente por cambios epigenéticos asociados a la técnica. Dicho hipertiroidismo provoca el aumento de la gluconeogénesis, el ciclo de Cori y la lipólisis en el tejido adiposo. Tal contexto metabólico predispone a estos niños a padecer un intolerancia a la glucosa y una resistencia a la insulina, además de aumentar el riesgo de patologías cardiometabólicas tales como la aterosclerosis (17).

4.3. Alteraciones en el desarrollo embrionario

Dentro de este grupo de alteraciones cabe destacar una serie de estudios realizados en casos de embarazos múltiples, concretamente en el caso de gemelos. Dichos estudios encontraron una posible relación entre las técnicas *in vitro* (FIV/ICSI) y el riesgo de que las criaturas resultantes padecieran síndrome de Goldenhar, también conocido como síndrome de displasia óculo aurículo vertebral (OAVS), o anencefalia (67,69). La patología de OAVS se caracteriza por la presencia de microsomía craneofacial, quistes dermoides oculares, apéndices periauriculares y malformación de las orejas. La causa de dicha patología actualmente se discute, puesto que algunos autores creen que podría ser debida a una desregulación epigenética en genes como BAPX1, mientras que otros estudios parecen mostrar que la posible causa podría ser una alteración en los vasos sanguíneos que irrigan al útero.

Estudios realizados al respecto muestran que las TRA que requieren pasos *in vitro* tales como FIV/ICSI, podrían mantener una relación con la presencia de dicha patología. Sin embargo, pese al estudio no se han conseguido elucidar causas etiológicas claras, aunque parece lógico pensar que el riesgo intrínseco de las TRA tales como la estimulación ovárica, las condiciones de tratamiento *in vitro* o la transferencia embrionaria podrían estar relacionados. Por otro lado, los investigadores creen que posiblemente el embrión resultante de las TRA no disponga de los nutrientes necesarios para llevar a cabo una correcta reprogramación genética en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Aun así, no se descarta el hecho de que la culpa podría yacer en los problemas de infertilidad de los padres (69).

En lo que respecta a los casos de anencefalia, se observó que los embarazos múltiples se encontraban dentro de un grupo de alto riesgo de padecer dicha malformación, los investigadores explicaron dicha relación mediante el efecto sinérgico

que tienen las TRA y los embarazos múltiples. Aunque, debido a las limitaciones del estudio no se pudieron elucidar causas etiológicas claras (67).

Otros estudios realizados en los últimos años muestran que las FIV, así como los tratamientos de fertilidad que requieren, podrían causar defectos en la blastogénesis temprana causando malformaciones musculoesqueléticas (68), o incluso aumentando el riesgo de hepatoblastomas (22). Lo curioso de algunas investigaciones es que se ha mostrado que el uso de embriones criopreservados disminuye el riesgo de alteraciones en la blastogénesis, esto podría deberse a que la criopreservación actúa como filtro descartando aquellos embriones no viables. Por otro lado, no se descartan las posibles repercusiones negativas que los tratamientos hormonales puedan tener (68).

5. Conclusiones

Tras toda la información recopilada durante el presente trabajo, se puede decir que a pesar de que existe información contradictoria al respecto, no se puede afirmar que las TRA estén exentas de riesgo alguno. Es posible que tanto la metodología como los tratamientos de fertilidad supongan un riesgo intrínseco de fallos en los mecanismos de impronta genómica, aumentando el riesgo de que se den patologías como el Síndrome de Angelman, el síndrome de Beckwith-Wiedemann o el síndrome de Goldenhar. Así como de alteraciones durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, aumentando el riesgo de que se den ciertas patologías tanto cardiometabólicas como cardiovasculares.

Actualmente, en lo que se refiere a factores etiológicos concretos, se especula que la manipulación y las condiciones *in vitro* podrían ser las causantes del riesgo que puedan suponer estas técnicas de reproducción humana asistida para la descendencia.

Bibliografía

1. Sociedad Española de Fertilidad. Saber más sobre: Fertilidad y reproducción asistida. Soc Española Fertil. 2012;81.
2. Serrano Ruiz Calderón JM. 25 años del primer niño probeta Acepresa. Acepresa. 2003;4.
3. Zegers-Hochschild, F.; Adamson, G.D.; Mouzon, J.; Ishihara, O.; Mansour, R.; Nygren KE Al. Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Organ Mund la Salud. 2010;11.
4. Luke B, Brown MB, Wantman E, Lederman A, Gibbons W, Schattman GL, et al. Cumulative Birth Rates with Linked Assisted Reproductive Technology Cycles. N Engl J Med. 2012;366(26):2483-91.
5. Romeo Casabona CM. Genética humana: Fundamentos para el estudio de los efectos sociales de las investigaciones sobre el genoma humano. 2009.
6. University of Washington Medical Center. Fertilización in vitro. Qué esperar. Univ Washingt Med Cent. 2000;55(19):1-17.
7. SEF (Sociedad Española de Fertilidad). Estudio y tratamiento de la pareja esteril. Adalia. Madrid. 2007. 679 p.
8. Escudero Velando LE. Estimulación ovárica en reproducción asistida. Rev Peru Ginecol y Obstet. 2012;58:191-9.
9. Madera IV. Reproducción Asistida. Soc española Ginecol y Obstet. 1978;1-38.
10. Ventura-Juncá P, Irarrázaval I, Rolle AJ, Gutiérrez JI, Moreno RD, Santos MJ. In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. Biol Res. BioMed Central; 2015;48(1):68.
11. Sánchez-Calabuig MJ, López-Cardona AP, Fernández-González R, Ramos-Ibeas P, Fonseca Balvís N, Laguna-Barraza R, et al. Potential Health Risks Associated to ICSI: Insights from Animal Models and Strategies for a Safe Procedure. Front public Heal. 2014;2:241.
12. Gilbert SF. Summary for Policymakers. En: Intergovernmental Panel on Climate Change, editor. Climate Change 2013 - The Physical Science Basis. 7.^a ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 1-30.
13. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. Embriología funcional: una perspectiva desde la biología del desarrollo. 3th ed. Ed. Médica Panamericana; 2007. 186 p.
14. Fallis A. Riesgos y complicaciones de las técnicas de reproducción asistida. J Chem Inf Model. 2013;53(9):1689-99.
15. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. BMJ. 2009;339:b2700.
16. López Moratalla N, Palacios Ortega S. [Delay the age of procreation, decline in fertility and increased use of assisted reproduction: risk of birth defects]. Cuad bioética Rev Of la Asoc Española Bioética y Ética Médica. 22(75):259-72.
17. Gkourogiani A, Kosteria I, Telonis AG, Margeli A, Mantzou E, Konsta M, et al. Plasma metabolomic profiling suggests early indications for predisposition to latent insulin resistance in children conceived by ICSI. Androulakis IP, editor. PLoS

- ONE. 2014. p. e94001.
18. Ooki S. Maternal age and birth defects after the use of assisted reproductive technology in Japan. *Int J Womens Health*. 2013;5:65.
 19. Hansen M, Kurinczuk JJ, Milne E, de Klerk N, Bower C. Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013;19(4):330-53.
 20. Hansen M, Kurinczuk JJ, de Klerk N, Burton P, Bower C. Assisted reproductive technology and major birth defects in western Australia. *Obstet Gynecol*. 2012;120(4):852-63.
 21. Coticchio G, Dal-Canto M, Guglielmo M-C, Mignini-Renzini M, Fadini R. Human oocyte maturation in vitro. *Int J Dev Biol*. 2012;56(10-12):909-18.
 22. Puumala SE, Ross JA, Feusner JH, Tomlinson GE, Malogolowkin MH, Krailo MD, et al. Parental infertility, infertility treatment and hepatoblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Hum Reprod*. 2012;27(6):1649-56.
 23. Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H, et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1803-13.
 24. Yan J, Huang G, Sun Y, Zhao X, Chen S, Zou S, et al. Birth defects after assisted reproductive technologies in China: analysis of 15,405 offspring in seven centers (2004 to 2008). *Fertil Steril*. 2011;95(1):458-60.
 25. Ooki S. Birth Defects in Singleton versus Multiple ART Births in Japan (2004–2008). *J Pregnancy*. 2011;2011:1-8.
 26. El-Chaar D, Yang Q, Gao J, Bottomley J, Leader A, Wen SW, et al. Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1557-61.
 27. Shiota K, Yamada S. Intrauterine environment-genome interaction and children's development (3): Assisted reproductive technologies and developmental disorders. *J Toxicol Sci*. 2009;34 Suppl 2:SP287-91.
 28. Bertelsmann H, de Carvalho Gomes H, Mund M, Bauer S, Matthias K. The risk of malformation following assisted reproduction. *Dtsch Ärzteblatt Int*. 2008;105(1-2):11-7.
 29. Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review. *Hum Reprod*. 2005;20(2):328-38.
 30. Olivennes F. Do children born after assisted reproductive technology have a higher incidence of birth defects? *Fertil Steril*. 2005;84(5):1325-6.
 31. Schieve LA, Rasmussen SA, Reefhuis J. Risk of birth defects among children conceived with assisted reproductive technology: providing an epidemiologic context to the data. *Fertil Steril*. 2005;84(5):1320-4.
 32. Lambert RD. Safety issues in assisted reproductive technology: aetiology of health problems in singleton ART babies. *Hum Reprod*. 2003;18(10):1987-91.
 33. Tararbit K, Lelong N, Houyel L, Bonnet D, Goffinet F, Khoshnood B. Assessing the role of multiple pregnancies in the association between tetralogy of Fallot and assisted reproductive techniques: a path-analysis approach. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9(1):27.
 34. Rimoldi SF, Sartori C, Rexhaj E, Cerny D, Von Arx R, Soria R, et al. Vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies: underlying mechanisms and future implications. *Swiss Med Wkly*. 2014;144:w13973.
 35. Yeung EH, Druschel C. Cardiometabolic health of children conceived by assisted

- reproductive technologies. *Fertil Steril*. 2013;99(2):318-26.
36. Rexhaj E, Paoloni-Giacobino A, Rimoldi SF, Fuster DG, Anderegg M, Somm E, et al. Mice generated by in vitro fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span. *J Clin Invest*. 2013;123(12):5052-60.
 37. White CR, Denomme MM, Tekpetey FR, Feyles V, Power SGA, Mann MRW. High frequency of imprinted methylation errors in human preimplantation embryos. *Sci Rep*. 2015;5:17311.
 38. Chen Z, Hagen DE, Elsik CG, Ji T, Morris CJ, Moon LE, et al. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(15):4618-23.
 39. Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, et al. Imprinting methylation errors in ART. *Reprod Med Biol*. 2014;13(4):193-202.
 40. de Waal E, Mak W, Calhoun S, Stein P, Ord T, Krapp C, et al. In vitro culture increases the frequency of stochastic epigenetic errors at imprinted genes in placental tissues from mouse concepti produced through assisted reproductive technologies. *Biol Reprod*. 2014;90(2):22-22.
 41. Camprubi C, Iglesias-Platas I, Martin-Trujillo A, Salvador-Alarcon C, Rodriguez MA, Barredo DR, et al. Stability of genomic imprinting and gestational-age dynamic methylation in complicated pregnancies conceived following assisted reproductive technologies. *Biol Reprod*. 2013;89(3):50-50.
 42. Qin J-Z, Pang L-H, Li M-Q, Xu J, Zhou X. Risk of chromosomal abnormalities in early spontaneous abortion after assisted reproductive technology: A Meta-Analysis. Yan W, editor. *PLoS One*. 2013;8(10):e75953.
 43. Chen Z, Robbins KM, Wells KD, Rivera RM. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. *Epigenetics*. 2013;8(6):591-601.
 44. Liang X-W, Cui X-S, Sun S-C, Jin Y-X, Heo Y, Namgoong S, et al. Superovulation induces defective methylation in line-1 retrotransposon elements in blastocyst. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11(1):69.
 45. de Waal E, Yamazaki Y, Ingale P, Bartolomei M, Yanagimachi R, McCarrey JR. Primary epimutations introduced during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are corrected by germline-specific epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(11):4163-8.
 46. Iliadou AN, Janson PCJ, Cnattingius S. Epigenetics and assisted reproductive technology. *J Intern Med*. 2011;270(5):414-20.
 47. Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MRW. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet*. 2010;19(1):36-51.
 48. Amor DJ, Halliday J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum Reprod*. 2008;23(12):2826-34.
 49. Bowdin S, Allen C, Kirby G, Brueton L, Afnan M, Barratt C, et al. A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod*. 2007;22(12):3237-40.
 50. Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, Karakitsios K, Mantzavinos T, Giotitsas N, et al. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl*. 2006;8(6):643-73.
 51. Allen C, Reardon W. Assisted reproduction technology and defects of genomic imprinting. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2005;112(12):1589-94.
 52. Maher ER. Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum Mol Genet*.

- 2005;14(suppl_1):R133-8.
53. Maher ER. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet.* 2003;40(1):62-4.
 54. Yin S, Song C, Wu H, Chen X, Zhang Y. Adverse Effects of High Concentrations of Fluoride on Characteristics of the Ovary and Mature Oocyte of Mouse. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129594.
 55. Wu X-F, Yuan H-J, Li H, Gong S, Lin J, Miao Y-L, et al. Restraint stress on female mice diminishes the developmental potential of oocytes: roles of chromatin configuration and histone modification in germinal vesicle stage oocytes. *Biol Reprod.* 2015;92(1):13.
 56. Ooki S. Birth defects after assisted reproductive technology according to the method of treatment in Japan: nationwide data between 2004 and 2012. *Environ Health Prev Med.* 2015;20(6):460-5.
 57. Kato O, Kawasaki N, Bodri D, Kuroda T, Kawachiya S, Kato K, et al. Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;161(1):46-50.
 58. Feuer S, Rinaudo P. Preimplantation stress and development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2012;96(4):299-314.
 59. Reefhuis J, Honein MA, Schieve LA, Rasmussen SA. Use of clomiphene citrate and birth defects, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2005. *Hum Reprod.* 2011;26(2):451-7.
 60. Han J, Chen H, Niu Z, Sun Y, Sun X, Zhao X, et al. [A 10-year survey on birth defects after in vitro fertilization-embryo transfer in Shanghai]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2010;45(2):124-7.
 61. Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, Christiansen M, Tabor A. First-trimester screening markers are altered in pregnancies conceived after IVF/ICSI. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;33(1):8-17.
 62. Gao W, Shen Y. [A meta-analysis on birth defects in both in vitro fertilization-embryo transfer infants and the naturally conceived children]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2009;43(6):513-6.
 63. Lie RT, Lyngstadaas A, Ørstavik KH, Bakketeig LS, Jacobsen G, Tanbo T. Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2005;34(3):696-701.
 64. Zádori J, Kozinszky Z, Orvos H, Katona M, Kaáli SG, Pál A. The incidence of major birth defects following in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(3):131-2.
 65. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2002;346(10):725-30.
 66. Azevedo AR, Pinho MJ, Silva J, Sa R, Thorsteinsdottir S, Barros A, et al. Molecular cytogenetics of human single pronucleated zygotes. *Reprod Sci.* 2014;21(12):1472-82.
 67. Ben-Ami I, Edel Y, Barel O, Vaknin Z, Herman A, Maymon R. Do assisted conception twins have an increased risk for anencephaly? *Hum Reprod.* 2011;26(12):3466-71.
 68. Halliday JL, Ukoumunne OC, Baker HWG, Breheny S, Jaques AM, Garrett C, et al. Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. *Hum Reprod.* 2010;25(1):59-65.

69. Wieczorek D, Ludwig M, Boehringer S, Jongbloet PH, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B. Reproduction abnormalities and twin pregnancies in parents of sporadic patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum/Goldenhar syndrome. *Hum Genet.* 2007;121(3-4):369-76.
70. Roca de Bes M. Carga psicológica en los tratamientos de reproducción asistida y sus implicaciones. 2012 p. 51-5.
71. García MM, Miranda EB. Impronta genómica. 1998;48:567-74.