

SUBFERTILIDAD, PREMATURIDAD EXTREMA Y ENCEFALOPATÍAS CONNATALES. ¿SABEMOS EL PRONÓSTICO A LARGO PLAZO?

Autor: Francisco Carratalá
Unidad de Neuropediatría. Hospital Universitario de San Juan de Alicante

INTRODUCCIÓN

En el año 1986, con la aplicación de los primeros estudios estadísticos multivariantes, Nelson y ElleMBERG hicieron caer varios mitos sobre la relación existente entre los considerados factores de riesgo perinatales y los hallazgos de patología neurológica a largo plazo en el niño ¹. Por ejemplo, lo que se asumía como una relación directa entre el grado de asfixia perinatal y la presencia posterior de parálisis cerebral quedó en entredicho cuando factores utilizados como variables independientes (el retraso mental materno, y la presencia malformaciones fetales) se encontraban en más del 95% de los pacientes de la serie estudiada, y que además habían desarrollado parálisis cerebral. Aquí se incluía el 21% de pacientes que tenían criterios de riesgo de asfixia perinatal. Poco antes, se estimaba que las anomalías cromosómicas eran las causantes del 42% de los casos de retraso mental, a la vez que se atribuía a los mismos mecanismos la presencia de abortos en hasta un 33% y la subfertilidad en hasta un 7% ². Por otra parte, mientras que la presencia de trastornos perinatales del tipo asfíctico puro quedaban relegados a un segundo plano, marcadores específicos de riesgo como la presencia de hemorragias cerebrales y convulsiones pasaron a ser los mayores indicadores de riesgo de desarrollo de enfermedades neurológicas graves ³. A esto se añadió en aquella época el bajo peso extremo. En estos pacientes se observó que entre los predictores de trastornos neurológicos a largo plazo, se encontraba de nuevo la presencia de malformaciones, a lo que se añadió, de nuevo con valor estadísticamente significativo, la presencia de ruptura prematura de membranas y la corioamnionitis ⁴ que indicaban como, factores infecciosos añadidos, podían ensombrecer el pronóstico neurológico del paciente. Estos trabajos supusieron el punto de partida para el análisis racional de las causas perinatales de los trastornos del neurodesarrollo humano, objetivos fundamentales de la presente revisión y que se centran en los factores genéticos y epigenéticos, que en etapas precoces del desarrollo pueden inducir malformaciones o lesiones que darán como resultado clínico anomalías en la ganancia de hitos del desarrollo y presencia de enfermedades neurológicas. Nos centraremos además en los problemas derivados de las intervenciones médicas utilizados para superar estas situaciones como las técnicas de fecundación asistida y la supervivencia de niños prematuros en el límite de la viabilidad gestacional.

Muchas más series y trabajos multicéntricos publicados durante los años 80 y 90s, siguieron dando peso al hecho de que factores genéticos podrían explicar

la mayoría de los trastornos neurológicos otrora justificados por los traumatismos y el estrés del parto⁵⁻⁷. La idea caló excepcionalmente bien en el ámbito de la neurología neonatal, aunque quedó endeble en ámbitos no tan especializados de la pediatría y para el público general, tal vez alentado por la presión ejercida desde algunos sectores judiciales especializados en problemas de mala práctica profesional.

Los grandes esfuerzos realizados en la tocurgia y las UCIN durante los años 70 y 80, no llevaron a una mejoría espectacular de las cifras en la prevención de trastornos neurológicos como las PCIs, que no presentaron mejorías superiores a los dos puntos respecto a estudios previos de prevalencia, y que en la década de los 90 presentaron un nuevo empeoramiento, justificable en la medida de que se abordaban pacientes con edades conceptuales más bajas^{5,7}.

Simultáneamente a estos fenómenos relacionados con los procesos perinatales, que en principio auguraban un fuerte impacto en la asistencia neuropediátrica del niño, se empieza a observar un aumento en la prevalencia de trastornos neuroconductuales como el autismo, los trastornos generalizados del desarrollo y los trastornos por déficit de atención e hiperactividad, sin que la mejora en los métodos diagnósticos y conocimientos de las nuevas patologías parezcan influir en su elevada prevalencia^{8,9}.

Por último, y como colofón al cúmulo de situaciones cambiantes sobre la patología neurológica relacionada con los fenómenos perinatales, observamos un aumento de los síndromes clásicos en sus variaciones genéticas atribuibles a mutaciones de novo, en un marco creciente de fertilizaciones asistidas¹⁰.

Todo este conjunto de circunstancias nos hace preguntarnos si algo está cambiando en nuestra práctica o en el estilo de vida moderno, que favorezca la aparición de este aumento de la prevalencia de los trastornos del neurodesarrollo y la patología neurológica pediátrica en nuestro ámbito asistencial, si es que realmente se produce.

Así, en esta revisión pretendemos actualizar que factores genéticos, prenatales y perinatales tienen una influencia probada en el desarrollo de patología neurológica en el niño.

Para ello ilustraremos algunas de las condiciones y áreas medicas que se apuntan en los últimos tiempos como la aplicación de los más novedosos avances en la biotecnología aplicados a la solución de patología humana en relación con la concepción y el desarrollo neurológico del niño y que se resumen en los siguientes aspectos: la subfertilidad parental y las técnicas de fecundación asistida; los avances en las terapias neonatales en relación a la prematuridad extrema; y por último los factores epigenéticos, que serían aquellos que bien a través de un efecto directo sobre los sistemas de transcripción de las proteínas o bien por influencias directas en los mecanismos de replicación genómico, provocarían la presencia de alteraciones en el sistema nervioso en desarrollo, de forma a menudo críptica, y que se manifestará como trastornos de origen indeterminado.

SUBFERTILIDAD PARETAL

En los trabajos descritos al principio, la subfertilidad se define empíricamente como causa posible de trastornos del neurodesarrollo en el niño, como lo describe la doctora K.B. Nelson^{1,3} utilizándolo como una variable independiente en sus estudios epidemiológicos. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos por los que se llega a esa subfertilidad, pueden ser muy variados, y en consecuencia, cuando se producen alteraciones en el neurodesarrollo del producto de dichos embarazos podemos esperar lesiones muy diferentes aunque con resultados clínicos próximos, como el retraso psicomotor, acompañado o no de anomalías estructurales del SNC¹¹. Este es el caso de la diabetes gestacional, que independientemente del tipo que desarrolle la madre, da como resultado un aumento de la prevalencia tanto de la mortalidad neonatal como de la morbilidad¹², clásicamente asociada al cuadro de bebés macrosómicos, con aumento inherente de los riesgos tocúrgicos.

Otros factores ambientales causantes de subfertilidad lo representan infecciones de tipo bacteriano, como el caso de las chlamydias, cuyas disfunciones tubáricas no sólo parecen encontrarse en la base de la subfertilidad, sino también en la aparición de partos prematuros¹³, y de ahí el subsiguiente proceso de trastornos del neurodesarrollo, si se ha vencido la situación inicial de subfertilidad. En otras ocasiones los agentes infecciosos implicados en procesos de subfertilidad, son virus con demostrada capacidad lesiva en el SNC del recién nacido, como es el caso de los citomegalovirus¹⁴. Así pues, defectos genéticos con consecuencias estructurales del SNC, o bien con anomalías bioquímicas cuya expresión clínica sea también malformaciones del SNC, ambos expresando finalmente el trastorno del neurodesarrollo, pueden en primera instancia manifestarse en los progenitores portadores de los genes como una situación de subfertilidad, como también lo hacen los factores infecciosos nombrados anteriormente.

La superación de la subfertilidad, bien de forma espontánea, bien de forma terapéutica, puede exponer al feto a las circunstancias adversas descritas, y ponerlo en situación de riesgo de lesión del SNC.

Por otra parte, la resolución etiológica de los factores causantes de subfertilidad citados, puede no ser suficiente, y se tiene que recurrir a las diferentes técnicas de fertilización asistida, cuyos procedimientos técnicos, por sí mismos, se han implicado en la aparición de trastornos del neurodesarrollo.

TÉCNICAS DE FERTILIZACIÓN ASISTIDA

El atribuir globalmente a todas las técnicas de fecundación asistida el mismo peso etológico en el posible desarrollo de trastornos del neurodesarrollo en el niño sería falaz, ya que el efecto global que implicase a todas y cada una de las técnicas estaría en relación con el proceso inductor de subfertilidad, tal y como hemos comentado en el apartado anterior. Por otra parte, el detallar este tipo de técnicas se encuentra más allá del objetivo de esta revisión, pero sí que será conveniente diferenciarlas a efectos de los estudios epidemiológicos que las analizan.

Aunque sólo una minoría de genes humanos muestra el fenómeno del imprinting, los pocos que se han identificado, se encuentran relacionados con el crecimiento neonatal y el neurodesarrollo. De esta manera se han descrito como mutaciones o epimutaciones de estos genes se manifiestan como síndromes que afectan al neurodesarrollo y entre ellos están los síndromes de Angelman (SA) y Beckwith-Wiedemann (B-W), que en los últimos tiempos registran un aumento de los antecedentes de utilización de técnicas e fecundación asistida.

En el año 2000, Manning y colaboradores, valoraron el estado de metilación del ADN, en una región definida del cromosoma 15q11-q13 en 92 niños concebidos con técnicas de ICSI, en los cuales pueden establecer la presencia de un patrón de metilación del ADN regular en la región del PWS/AS, sin que ningún niño presentara además sintomatología del mismo¹⁵. Sin embargo, frente a estas series parciales, existe un incesante goteo de casos en los que se describe la aparición de Síndrome de Angelman en pacientes procedentes de técnicas de fecundación asistida^{16, 17} para culminar en la descripción de series en las que de 16 pacientes que presentaban SA, cuatro presentaban antecedentes de subfertilidad parental que fue resuelta mediante técnicas de ICSI, lo que generaba un riesgo relativo en estas parejas de tener un hijo afecto de un 25%, y que era similar al que presentaban las familias que se sometían durante al menos dos años a técnicas de estimulación hormonal. Sin embargo, este riesgo se duplicaba cuando en la misma pareja se aunaban las dos técnicas, lo que sugirió a los autores en ese momento que más que la técnica de ICSI, el mecanismo patogénico del proceso se debía a un fenómeno de superovulación¹⁸.

Experiencias personales, nos han mostrado que en casos de SA de reciente aparición en nuestro medio, producto de embarazo gemelar con técnica de ICSI, en la que la madre no tenía el fenómeno de imprinting y constituía por lo tanto una mutación de novo.

Series más amplias, sugieren la presencia real de la asociación de los fenómenos de imprinting, aunque en apariencia, sólo relacionados con el SA. Sin embargo, esta relación no es tan evidente con otros síndromes de imprinting como el Praeder-Willi (PW) o el B-W. Para comprobar estas diferencias, Sutcliffe y colaboradores contactaron familias de pacientes con B-W, PW, SA y pacientes que sufrieron diabetes mellitus transitoria neonatal. Los resultados mostraron un aumento significativo de las técnicas de fecundación asistida en aquellos pacientes con SA y BW, mientras que dicha asociación no se confirmó para los pacientes con PW y diabetes mellitus transitoria. Estas diferencias parecen revelar, según los autores, la presencia de diferentes mecanismos para los distintos trastornos por imprinting, además de una diferencia en las sensibilidad de las regiones a los diferentes trastornos de la metilación del ADN¹⁹.

Así pues, las influencias en el neurodesarrollo a largo plazo de los pacientes que fueron producto de técnicas de fecundación asistida siguen siendo

controvertidas, especialmente de aquellos pacientes que fueron obtenidos a través de ICSI.

En un estudio reciente de casos y controles sobre una población de 34 recién nacidos por ICSI y 39 controles, los pacientes fueron revisados en tres áreas diferentes (motor fino, motor grueso y lenguaje) a las edades de 18 y 40 meses. En la primera revisión, cinco niños del grupo ICSI, frente a dos controles presentaron malformaciones congénitas mayores ($p=0,2$), y cuatro contra ningún control presentaron malformaciones severas ($p=0.04$). Estas cifras aumentaron en la revisión de los 40 meses, entre las que se encontraron cinco niños más del grupo ICSI y cuatro de los controles, concluyendo los autores que efectivamente esta técnica lleva asociada, de forma estadísticamente significativa, la presencia de malformaciones mayores, aunque no todas especialmente relacionadas con el fenómeno de imprinting²⁰.

Sin embargo, series desarrolladas en ambientes similares, y en las que se hacía una revisión de 2492 niños nacidos tras técnicas de reproducción asistida en la República de Irlanda y el centro de Inglaterra, buscando la presencia de SA y de B-W no corroboraron estos resultados. Con una respuesta inicial del 61%, se registró la presencia de un solo caso de B-W y ninguno de SA, por lo que los autores concluyen que el riesgo de trastornos de imprinting es $< 1\%$, si bien acepta que existe un bajo nivel de participación en respuesta al estudio²¹.

Estudios de revisión de la literatura, se han concentrado de nuevo en la presencia de trastornos de imprinting como el B-W y el SA, a la vez que en el retinoblastoma, y se han intentado relacionar con resultados a favor de la relación con las técnicas de fecundación asistida. La mayor parte de las publicaciones americanas, europeas y australianas, muestran una clara relación entre el B-W y la historia de aplicación de técnicas de reproducción asistida, lo que ocurre igual con el SA, aunque sólo se encuentra una referencia para el retinoblastoma²² que no confirma esta asociación.

Todos los resultados expuestos aquí sugieren que existe una tendencia clara, aunque no siempre comprobada en todas las series, de que los fenómenos de imprinting están relacionados con las técnicas de reproducción asistida, especialmente las ICSI. De los trastornos relacionados, se derivarán complejas patologías neuropediátricas, que en su mayor parte son encuadradas dentro de los grupos de enfermedades raras, por lo que quedarán atomizadas a nivel clasificatorio, y difícilmente utilizables como variables dependientes de factores controladores como las técnicas de reproducción asistida, lo que contribuirá a la subestimación de su papel en la patología del neurodesarrollo.

Por otra parte, hemos podido observar en nuestro grupo, como pacientes que presentaban malformaciones estructurales mayores del SNC, y que como consecuencia de los cuales mostraban importantes trastornos del neurodesarrollo, tenían mutaciones en una de las regiones calientes vulnerables del genoma humano, la región crítica de la lisencefalia situada en los brazos cortos del cromosoma 17. En éstos, la prevalencia de técnicas de fertilización era más elevada (datos pendientes de publicación). En los dos últimos casos en los que la mayor malformación estructural era la lisencefalia, ambos pacientes compartían mutaciones en la misma región y el antecedente de ser producto de ICSI.

Hay otros trastornos clásicos con un origen genético claramente determinado, como la esclerosis tuberosa, que presentan en nuestra experiencia antecedentes de ICSI con ausencia de síntomas maternos y teóricamente del donante. El estudio genético reveló la presencia de una mutación de novo, que si posibles, no son el patrón más frecuente de herencia. Esta asociación no se encuentra en la literatura disponible, pero teniendo en cuenta los mecanismos genéticos que guían su expresión, la mutación de novo puede indicar la presencia de un agente mutagénico no controlado actuando sobre zonas especialmente sensibles del genoma, tal y como hemos descrito para la región crítica de la lisencefalia.

Sin embargo, otras anomalías de las que conocemos una herencia poligénica, como es el caso de los trastornos del espectro autista (TEA), son más difíciles de trazar, en parte por la dificultad de algunos padres para admitir la presencia, en el contexto del paciente neuroconductual, primero del problema, y segundo admitir las condiciones de subfertilidad que han llevado a la pareja a utilizar técnicas de fecundación asistida. En relación con esta posible asociación, hemos visto como en un estudio en el que comparaban 87 niños de ICSI, con 92 fecundaciones in vitro y 85 controles normales, se producía un aumento significativo de la prevalencia de TEA²³.

No se encontraron estudios en relación a otros cuadros neuroconductuales como el TDAH y trastornos puramente psiquiátricos.

Por lo expuesto en este apartado, creemos que el posible efecto nocivo real en los linajes producto de las técnicas de fecundación asistida, aunque todavía está por determinar su impacto real, no sólo en los espacios genómicos y anatómicos del sujeto expuesto, sino a nivel del neurodesarrollo y su relación con lo que a veces se piensan trastornos menores (soft neurological signs) como los neuroconductuales.

PREMATURIDAD EXTREMA

Cuando se ha analizado la prevalencia de la subfertilidad materna y la influencia que las técnicas de fecundación asistida tienen en la aparición de trastornos del neurodesarrollo a largo plazo, la mayoría de los autores descuentan el efecto que la prematuridad asociada a estas técnicas, sea por la multiparidad, sea por sí mismas, puesto que los riesgos de la prematuridad son conocidos y fuera de debate, ya que muchos de los mecanismos fisiopatológicos a través de los que se produce la lesión neural se consideran a menudo como un mal menor durante el período postnatal inmediato. Así la reperfusión en los problemas de intercambio respiratorio, los efectos de los corticoides a nivel cerebral utilizados para la maduración pulmonar y la prevalencia de las infecciones neonatales concomitantes a la larga exposición de estos pacientes a un mundo exterior para el que inmunitariamente no están del todo preparados, son algunos ejemplos de los factores que se pueden encontrar en el empeoramiento del pronóstico neurológico a largo plazo, y que se pueden asumir como condiciones aceptables en el balance de riesgo benefició. Pero sin embargo, el aumento de las capacidades tecnológicas

neonatales, nos ha llevado a conseguir supervivencia a edades gestacionales que indefectiblemente aumentan el periodo de riesgo de todos estos mecanismos comentados.

Sin embargo, la duda que surge es: ¿Cuál es el límite inferior de las edades gestacionales de los grandes prematuros, a partir de los cuales sea ético realizar una intervención para reanimar al niño?

El espectacular desarrollo de las técnicas en las UCI Neonatales a finales del siglo XX, llevó a una desenfrenada carrera para rebajar el límite de la edad gestacional en la que se debía proceder a la reanimación de los prematuros extremos. En un estudio de opinión sobre neonatólogos australianos y enfermeras especializadas, sobre a que edad gestacional intentar la reanimación se mostró un acuerdo casi absoluto entre ambos cuerpos asistenciales con la edad de 24 semanas. Ocasionalmente, un 23% de los neonatólogos resucitarían a las 22 semanas, mientras que no lo haría ninguna enfermera²⁴. Esto sugiere, como factores externos de tipo ético, personal o educativo interfiere en la percepción del pronóstico de estos niños, concibiendo como poco éticos o carentes de valor los esfuerzos de reanimación en ese grupo de edad.

En un estudio realizado en Austria entre los años 2000-2001, se investigo retrospectivamente en la morbilidad y mortalidad de los niños nacidos con 24-26 semanas de edad gestacional. De los 581 nacidos vivos en ese período, se analizaron 508. La mortalidad fue de un 83%, 76%, 43%, 26% y 13% para las 22, 23, 24, 25 y 26 semanas. La frecuencia de Parálisis Cerebral a la edad de 12 meses para cada uno de los grupos de edad fue de: 33%,50%33%,26% y 25%, aumentando la mortinatalidad conforme descendemos en edad gestacional²⁵.

Otros estudios realizados a más largo plazo, han establecido como circunstancia relacionada, la adecuada ganancia de peso intrauterino y en las primeras etapas de la vida, como una influencia positiva en el neurodesarrollo a largo plazo (edad de 4 años). De ese modo, un desarrollo ponderoestatural correcto acompañado de un crecimiento del perímetro cefálico adecuado, parecían presentar un desarrollo cognitivo favorable, pero que en ningún caso sobrepasaba los efectos negativos que los procesos intercurrentes asociados a la prematuridad como hemorragias intracraneales o infecciones neonatales²⁶ pudiesen suponer.

Resulta difícil obtener series en las que la comparación se haga de forma exclusiva con los pacientes en las semanas críticas de viabilidad, que al parecer, a la luz de los conocimientos y posibilidades tecnológicas actuales, no debería bajar de las 24 semanas. Casi siempre quedan incluidos en grupos de mayor edad o peso, con lo que no se puede discriminar exactamente el peso exacto que la edad gestacional, tiene a nivel del resultado neurológico a largo plazo.

Por otra parte, son escasas las series que mantienen seguimientos de estos pacientes a muy largo plazo, y los resultados del desarrollo neurocognitivo se

paran en etapas preescolares, mientras que en edades anteriores, sólo se considera como anomalía grave la presencia de trastornos neurológicos mayores como parálisis cerebral y/o epilepsia.

Desde el año 1992 en que el primer 24 semanas fue dado de alta de su Hospital, el Leeds General Infirmary en el Reino Unido, hasta los que todos tenemos alguna experiencia positiva en nuestros centros de algún paciente de las mismas características, que nos hace sobrecogernos al pensar que en algunos estudios de coste/beneficio, se cuestionan la relevancia de este tipo de actuaciones.

La prematuridad extrema es una situación de mucho estrés para familiares y profesionales, y la indicación de viabilidad, probablemente debería hacerse de forma individual en cada paciente, con el consenso de profesionales, padres y asesores de los mismos sobre temas biomédicos.

CONCLUSIONES

Hasta hace poco tiempo, el diagnóstico preimplantacional se utilizó para la selección de embriones sanos en presencia de enfermedades con mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas. Sin embargo en el momento actual se está extendiendo a procesos de inicio tardío en la vida del sujeto como el cáncer de mama y de ovario, lo que sin duda abre unas dificultades éticas de difícil resolución en un marco de consulta habitual.

Además, muchas de estas técnicas requieren de la participación de procedimientos que en el momento actual, siguen teniendo una seguridad limitada. Como hemos visto, los efectos sobre la prole de las técnicas de fecundación asistida y de manejo de la prematuridad extrema, permanecen controvertidos. Nos sorprende en la práctica diaria, como la mayoría de las familias con niños con trastornos del neurodesarrollo que han sido producto de alguna de estas técnicas se pregunten, tras la consulta de fuentes de información accesibles en la web, por esta posible relación causal, y nos llama la atención la poca consciencia que de los riesgos y dudas aquí planteados tienen antes de someterse a los procedimientos correspondientes. Pensamos que los padres que ponen la confianza en estas técnicas deben ser profusamente informados sobre estos efectos adversos a la vez que lo son de las ventajas que se pueden derivar de estas prácticas, y así permitir a las familias optar libremente, y sin coacción social alguna, sobre los riesgos que están dispuestos a asumir sobre su descendencia.

Sin duda, ante una materia de esta sensibilidad, los profesionales debemos mantener el compromiso de vigilar bibliográficamente o epidemiológicamente, los cambios y novedades que puedan existir en este sentido, colaborando en el desarrollo de series multicéntricas o aportando a congresos el caso especial, pero lo que nunca debe ocurrir es que la información sobre estos pacientes no quede registrada y documentada para posibles análisis posteriores. No cabe recomendar en este campo que se deben hacer más estudios, lo que cabe es el compromiso de hacerlos nosotros mismos en nuestro medio para prevenir

situaciones desalentadoras en familias a las que se habían dado expectativas diferentes.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Nelson KB, Ellenberg JH. Antecedents of cerebral palsy. Multivariate analysis of risk. *N Engl J Med* 1986; 315(2):81-86.
2. Hook EB. Contribution of chromosome abnormalities to human morbidity and mortality. *Cytogenet Cell Genet* 1982; 33(1-2):101-106.
3. Nelson KB, Broman SH. Perinatal risk factors in children with serious motor and mental handicaps. *Ann Neurol* 1977; 2(5):371-377.
4. Nelson KB, Ellenberg JH. Predictors of low and very low birth weight and the relation of these to cerebral palsy. *JAMA* 1985; 254(11):1473-1479.
5. Robertson CM, Finer NN. Long-term follow-up of term neonates with perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1993; 20(2):483-500.
6. Sinclair DB, Campbell M, Byrne P, Prasertsom W, Robertson CM. EEG and long-term outcome of term infants with neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Clin Neurophysiol* 1999; 110(4):655-659.
7. Thompson DG. Consequences of perinatal asphyxia. *AACN Clin Issues Crit Care Nurs* 1994; 5(3):242-245.
8. Rumeau-Rouquette C, Grandjean H, Cans C, du MC, Verrier A. Prevalence and time trends of disabilities in school-age children. *Int J Epidemiol* 1997; 26(1):137-145.
9. Garcia G, Prieto Tato LM, Santos BJ, Monzon CL, Hernandez FA, San Feliciano ML. [Attention deficit and hyperactivity disorder, a current problem]. *An Pediatr (Barc)* 2008; 69(3):244-250.
10. Allen C, Reardon W. Assisted reproduction technology and defects of genomic imprinting. *BJOG* 2005; 112(12):1589-1594.
11. Jonasson JM, Brismar K, Sparen P et al. Fertility in women with type 1 diabetes: a population-based cohort study in Sweden. *Diabetes Care* 2007; 30(9):2271-2276.
12. Macintosh MC, Fleming KM, Bailey JA et al. Perinatal mortality and congenital anomalies in babies of women with type 1 or type 2 diabetes in England, Wales, and Northern Ireland: population based study. *BMJ* 2006; 333(7560):177.
13. Hollegaard S, Vogel I, Thorsen P, Jensen IP, Mordhorst CH, Jeune B. Chlamydia trachomatis C-complex serovars are a risk factor for preterm birth. *In Vivo* 2007; 21(1):107-112.
14. Eggert-Kruse W, Reuland M, Johannsen W, Strowitzki T, Schlehofer JR. Cytomegalovirus (CMV) infection--related to male and/or female infertility factors? *Fertil Steril* 2009; 91(1):67-82.
15. Manning M, Lissens W, Bonduelle M et al. Study of DNA-methylation patterns at chromosome 15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(11):1049-1053.
16. Cox GF, Burger J, Lip V et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71(1):162-164.
17. Orstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB et al. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003; 72(1):218-219.

18. Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005; 42(4):289-291.
19. Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S et al. Assisted reproductive therapies and imprinting disorders--a preliminary British survey. *Hum Reprod* 2006; 21(4):1009-1011.
20. Sanchez-Albisua I, Borell-Kost S, Mau-Holzmann UA, Licht P, Krageloh-Mann I. Increased frequency of severe major anomalies in children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Dev Med Child Neurol* 2007; 49(2):129-134.
21. Bowdin S, Allen C, Kirby G et al. A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 2007; 22(12):3237-3240.
22. Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2009; 91(2):305-315.
23. Knoester M, Helmerhorst FM, van der Westerlaken LA, Walther FJ, Veen S. Matched follow-up study of 5 8-year-old ICSI singletons: child behaviour, parenting stress and child (health-related) quality of life. *Hum Reprod* 2007; 22(12):3098-3107.
24. Oei J, Askie LM, Tobiansky R, Lui K. Attitudes of neonatal clinicians towards resuscitation of the extremely premature infant: an exploratory survey. *J Paediatr Child Health* 2000; 36(4):357-362.
25. Weber C, Weninger M, Klebermass K et al. Mortality and morbidity in extremely preterm infants (22 to 26 weeks of gestation): Austria 1999-2001. *Wien Klin Wochenschr* 2005; 117(21-22):740-746.
26. Franz AR, Pohlandt F, Bode H et al. Intrauterine, early neonatal, and postdischarge growth and neurodevelopmental outcome at 5.4 years in extremely preterm infants after intensive neonatal nutritional support. *Pediatrics* 2009; 123(1):e101-e109.