

# ARTÍCULO ESPECIAL

## Efectos hormonales en los recién nacidos concebidos mediante tecnología de reproducción ayudada

Patricia Martín Rojas-Marcos, MD<sup>a</sup>, Raphael David, MD<sup>b</sup>, y Brenda Kohn, MD<sup>b</sup>

**OBJETIVO:** Describir a 7 recién nacidos concebidos mediante tecnología de reproducción asistida (TRA) que presentaron desarrollo mamario, vello pubiano o ambas características. La presentación clínica de estos recién nacidos significa que la alteración del medio hormonal intrauterino podría incidir sobre el feto y el recién nacido concebido mediante TRA.

**MÉTODO:** Entre mayo de 2001 y abril de 2004, 7 niños de entre 5 y 21 meses de edad, concebidos mediante TRA, fueron remitidos por sus pediatras a la New York University School of Medicine, Division of Pediatric Endocrinology para evaluar una posible pubertad precoz. Los pacientes fueron evaluados respecto a la pubertad precoz de mediación central y a la seudopubertad precoz, es decir, de origen ovárico o suprarrenal.

**RESULTADOS:** La evaluación endocrina de todos los pacientes demostró unos valores de hormonas y esteroides sexuales en la gama prepuberal; la ecografía pelviana confirmó la existencia de ovarios prepúberales con útero no estimulado. El seguimiento clínico de nuestros pacientes no revela, hasta ahora, la progresión del desarrollo mamario o la pubarquía ni el aumento de los esteroides sexuales.

**CONCLUSIONES:** Está bien demostrado que las concentraciones de hormonas en el feto influyen sobre el desarrollo del sistema endocrino en el feto y la maduración de los sistemas de control endocrino. Todavía no sabemos si la TRA modifica el medio hormonal intrauterino del feto en crecimiento concebido mediante TRA, lo que supone un área de investigación actual. Los pacientes concebidos mediante TRA que presenten manifestaciones hormonales, incluyendo los nuestros, deben ser controlados durante la infancia y la adolescencia, hasta la edad adulta, para determinar la existencia o no de alguna perturbación en la cronología de la pubertad y en la posterior fecundidad.

El desarrollo de nuevas técnicas en la tecnología de reproducción asistida (TRA) ha mejorado la capacidad de concebir de parejas estériles. Los datos del American

Society of Reproductive Medicine's National In Vitro Fertilization Registry indican que, en 1999, 88.077 ciclos de tratamiento de reproducción asistida desembocaron en 21.904 partos con 30.967 neonatos<sup>1</sup>. Esto equivale a una tasa de éxito (partos por transferencia) del 30,5%, con un aumento del 17% respecto a 1992. Este aumento está relacionado con la mayor tasa de éxito de implantación y con el aumento del número de embarazos múltiples. En la actualidad, la TRA es responsable del 1-2% de los partos en Estados Unidos<sup>1</sup>.

Numerosos estudios han explorado el tipo y la incidencia de efectos secundarios relacionados con la TRA en los frutos. Entre los efectos secundarios más habituales encontramos el bajo peso al nacimiento ( $\leq 2.500$  g) entre los recién nacidos a término (razón de riesgo = 2,6; intervalo de confianza [IC] del 95%, 2,4-2,8) y el nacimiento pretérmino de fetos únicos (razón de riesgo = 1,3; IC del 95%, 1,2-1,4) concebidos mediante TRA<sup>2</sup>. Este aumento del riesgo persiste tras el ajuste respecto a la edad y la paridad materna, la edad gestacional al parto, los procesos de reducción multifetal y la causa de esterilidad. Aunque varios estudios no observan aumento del riesgo de malformaciones congénitas de los niños concebidos mediante TRA<sup>3,4</sup>, otros han demostrado que la prevalencia de 1 o más defectos congénitos mayores al año de edad es doble en los lactantes concebidos mediante TRA<sup>5</sup>. En un registro de casos de Beckwith-Wiedemann con 65 niños con este síndrome, 3 (5%) habían sido concebidos mediante fertilización *in vitro* (FIV), tasa superior a la esperada (0,8%)<sup>6</sup>.

Los estudios iniciales no demuestran un aumento del riesgo de cáncer entre los niños concebidos mediante TRA<sup>7,8</sup>. Más recientemente, varios informes, incluyendo un estudio holandés, han concluido que el riesgo relativo de retinoblastoma es significativamente mayor<sup>9</sup>.

Varios factores asociados con el tratamiento TRA pueden contribuir a las posibles evoluciones anómalas, como la edad relativamente avanzada de las parejas estériles que solicitan TRA, las causas subyacentes a su esterilidad, las medicaciones utilizadas para inducir la ovulación o mantener el embarazo en sus etapas iniciales y los propios procedimientos TRA.

El objetivo de este informe es describir a 7 lactantes nacidos mediante TRA que presentaron desarrollo mamario, del vello pubiano, o ambas características. Los autores consiguieron los datos de este informe mediante la asistencia directa al paciente y la revisión retrospectiva de la historia clínica.

<sup>a</sup>Departamento de Endocrinología y Nutrición. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España. <sup>b</sup>Department of Pediatrics. Division of Pediatric Endocrinology. New York University School of Medicine. New York. EE.UU.

TABLA 1. Datos de laboratorio

N.º	LH <sup>a</sup> /FSH <sup>b</sup> (mU/ml)	E2 <sup>c</sup> /E1 <sup>d</sup> (pg/ml)	DHEA-S <sup>e</sup> /delta-4-androstenediona <sup>f</sup> ( $\mu$ g/dl; ng/dl)	Testosterona <sup>g</sup> (ng/dl)	17-hidroxiprogesterona <sup>h</sup> /corticotropina (ng/dl; $\mu$ g/dl)	Ecografía ovárica <sup>i</sup> (cm)	Edad ósea (meses; EC $\pm$ DE)
1	< 0,3/2,3	13/	28/23	—	—	I: 1,6 $\times$ 0,9 $\times$ 1,2 D: 2,2 $\times$ 1,2 $\times$ 0,9	9 meses (8 $\pm$ 1,4)
2	1/16	15/< 15	12/			Suprarrenales normales I: 1,2 $\times$ 0,4 $\times$ 0,8 D: 1,1 $\times$ 0,6 $\times$ 0,7	21 meses (15 $\pm$ 3)
3	< 1/5	21/-	9/11	7	24/-	Suprarrenales normales I: 1 $\times$ 1,9 $\times$ 0,7 D: 0,7 $\times$ 1,4 $\times$ 0,8	21 meses (16 $\pm$ 3)
4	< 1/5	7/-	5/	10		Suprarrenales normales I: 0,9 $\times$ 0,5 $\times$ 0,6 D: 0,9 $\times$ 1,2 $\times$ 1,0	12 meses (10 $\pm$ 2,1)
5		12/-	< 3/			Suprarrenales normales I: 0,9 $\times$ 0,5 $\times$ 0,6 D: 0,9 $\times$ 1,2 $\times$ 1,0	12 meses (10 $\pm$ 2,1)
6			21/	< 4	< 20/3,81		6-9 meses (6 $\pm$ 2,1)
7	—	—	32	19/39 basal/tras ACTH	Tras ACTH 221/		7 meses (5 241 2,1)

<sup>a</sup>LH 0,02-7,0 mU/ml (2 semanas-11 meses); 0,02-0,03 mU/ml (12 meses-8 años)<sup>b</sup>FSH 0,16-4,1 (varón 0-1 años); 0,24-14,2 (mujer < 2 años); FSH 0,26-3,0 (varón: 12 meses-8 años); 1,0-4,2 (mujer: < 2-8 años).<sup>c</sup>E2 < 24 pg/ml (12 meses-8 años).<sup>d</sup>E1 < 15 pg/ml (2 semanas-8 años).<sup>e</sup>DHEA-S < 5-57  $\mu$ g/dl (6 meses-6 años).<sup>f</sup>Delta-4 6-68 pg/ml (6 meses-8 años).<sup>g</sup>Testosterona 75-400 ng/dl (varón); 3-10 ng/dl (mujer); 3-10 ng/dl (V/M > 7 meses-8 años).<sup>h</sup>17-hidroxiprogesterona < 106 ng/dl (6 meses-8 años).<sup>i</sup>Volumen ovárico (sagital  $\times$  AP  $\times$  transverso  $\times$  0,52). No estimulado < 1,2 cm<sup>3</sup>.

LH: hormona luteinizante; FSH: hormona foliculoestimulante; E: estrona; DHEA-S: sulfato de dehidroepiandrosterona; I: izquierda; D: derecha; ACTH: corticotropina.

## MÉTODO

Todos los pacientes se sometieron a un análisis inicial de hormonas. Las pacientes que mostraron desarrollo mamario y vello pubiano fueron evaluadas respecto a la posibilidad de precocidad sexual. En estas pacientes se determinó el valor de hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estradiol y sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEA-S), y se realizó una ecografía ovárica (pacientes 1-4). Los pacientes que presentaron principalmente vello pubiano (pacientes 5-7) también fueron evaluados respecto a las causas de hiperandrogenismo, como la hiperplasia suprarrenal congénita. En ellos se determinó DHEA-S, la testosterona sérica y la 17-hidroxiprogesterona (tabla 1). Además, se determinó la edad ósea de todos los pacientes mediante radiografía de la mano y la muñeca izquierda.

Los análisis de laboratorio de las pacientes 1, 3 y 5 fueron realizados en Queso Diagnostics, California, Estados Unidos. La medición de cortisol, estradiol, DHEA-S y testosterona se realizó por quimioluminiscencia; la de 17-hidroxiprogesterona, delta-4-androstenediona y estrona mediante determinación radioinmune, y la de LH y FSH mediante determinación inmune microenzimática. El análisis de los valores de andrógenos de los pacientes 2, 4, 6 y 7 se realizó en el mismo hospital. La determinación radioinmune de testosterona, 17-hidroxiprogesterona y DHEA-S se efectuó en nuestro laboratorio con una metodología bien descrita<sup>10</sup>. La determinación radioinmune de testosterona y 17-hidroxiprogesterona se realizó tras la purificación mediante cromatografía *celite*. Los coeficientes intra e interdeterminación fueron del 6 y el 11%, respectivamente, para la testosterona y del 11 y el 15%, respectivamente, para 17-hidroxiprogesterona. Sin embargo, la determinación inmune de DHEA-S se efectuó sin purificación.

El estudio de estimulación con corticotropina (ACTH) del paciente 7 se realizó con administración intravenosa de 0,25 mg de cosintropina (Organon) en el minuto 0. A los 60 min se tomó suero para determinar la concentración de testosterona y 17-hidroxiprogesterona.

La valoración de la edad ósea se realizó con métodos bien establecidos<sup>11</sup>. La New York University School of Medicine, Division of Pediatric Radiology, realizó la ecografía pélviana y suprarrenal de todos los pacientes, excepto la 1, que se sometió al procedimiento en el Lenox Hill Hospital, Nueva York.

Todos los pacientes menos 2 (pacientes 2 y 4), evaluados recientemente, fueron visitados en la consulta de seguimiento durante un período de entre 3 y 20 meses.

## POBLACIÓN DE PACIENTES

Entre mayo de 2001 y abril de 2004, 7 niños de entre 5 y 21 meses de edad, concebidos mediante TRA, fueron remitidos por sus pediatras a la New York University School of Medicine, Division of Pediatric Endocrinology, para evaluar el desarrollo mamario, de vello pubiano, o ambas circunstancias. Eran 6 niñas y 1 niño. La tabla 2 presenta las características de la muestra, incluyendo los hallazgos clínicos.

Todas las madres habían recibido tratamiento con FSH recombinante (r-FSH), seguida de gonadotropina coriónica humana recombinante (r-hCG) y progesterona, según los protocolos establecidos de la TRA<sup>12-15</sup>. El informe verbal de las familias, excepto la 4 y la 5, indicó que el tratamiento médico con TRA estuvo motivado por anovulación materna o incapacidad de concebir espontáneamente. La familia de la paciente 5 se sometió a TRA y a tratamiento de la oligospermia paterna. Además del tratamiento hormonal materno estándar (para la FIV), el padre de la paciente 5 fue tratado con teslac, clomifeno e indometacina. La paciente 4 fue concebida mediante FIV con esperma de donante. Ninguno de los pacientes tenía antecedentes familiares de hiperplasia suprarrenal congénita, síndrome del ovario poliquístico o pubertad precoz. Todas las madres negaron el consumo de medicación por alteraciones sistémicas o endocrinas durante el embarazo.

Los pacientes 1 y 2 nacieron a los 7 meses de embarazo, con un peso al nacimiento de 3,5 y 1,81 kg, respectivamente. Los pacientes 3, 4, 6 y 7 fueron a término, y su peso al nacimiento fue adecuado a la edad gestacional. El trasfondo genético de las familias fue diverso, sin predominio en la población de pacientes. La paciente 5 fue el producto a los 8 meses de un embarazo gemelar que inicialmente fue un embarazo cuádruple. Según la madre, el gemelo varón estaba creciendo con normalidad, sin evidencia de pubarquia.

En la exploración física, todos eran lactantes con buen estado general. Las pacientes 1-4 mostraron tejido mamario bilateral bien desarrollado y vello pubiano (estadio II-III de Tanner). Las pacientes 5 y 6-2 niñas— mostraron vello pubiano Tanner III con mínimo tejido mamario. Ninguna de las niñas mostró hipertrrofia del clítoris ni fusión posterior de los labios. El paciente 7, un varón, presentó vello pubiano terminal en el escroto, pero sin hipertrrofia gonadal ni genital.

La revisión de la trayectoria de crecimiento lineal indicó que todos los lactantes a término estaban creciendo por sus canales de percentil. Las pacientes 1, 2 y 5, que habían nacido prematuramente, mostraban un crecimiento de recuperación compatible con los patrones de crecimiento de la prematuridad.

TABLA 2. Datos clínicos

N.º	Edad, sexo	Edad gestacional	Peso/talla	Hallazgos clínicos el día de la consulta		Hallazgos al nacer	Historia clínica
				Telarquia	Pubarquia		
1	8 meses, M	7 meses	95/95%	Tejido glandular nodular firme. Aréola < 1,5 cm	Vello terminal largo y rizado. Tanner (T) III	Presencia de tejido mamario y vello pubiano en el nacimiento	
2	15 meses, M	7 meses	< 5/25%	Tejido bilateral redondo y firme (D: 5 × 4 cm; I: 4 × 4 cm)	Vello mínimo blanco pálido < 1 cm de longitud. T II	Adherencias vaginales	Presencia de tejido mamario a los 10 meses
3	16 meses M	A término	25/25%	Tejido bilateral redondo y firme (6 cm de diámetro). Aréola 1 cm	Vello pálido corto apenas visible. T II	Presencia de tejido mamario al nacimiento	
4	21 meses, M	A término	75/75%	Tejido bilateral redondo y firme. (I 4 cm; D 3 cm)	Vello corto y oscuro. T II	Presencia de tejido mamario al nacimiento	Presencia de vello púbico a los 6 meses
5	10 meses, M	8 meses	< 5/25%	Tejido glandular bilateral (2,5 cm de diámetro). Aréola < 1,5 cm	Vello terminal escaso, largo y rizado. T III	Dudosos	Presencia de tejido mamario y vello pubiano a los 6 meses
6	6 meses, M	A término	75/90%	Tejido mamario derecho apenas palpable. Ausencia de tejido mamario izquierdo	Vello terminal largo y rizado en los labios. Vello apenas visible en el monte de Venus. T III	Presencia de galactorrea; ausencia de tejido mamario	Presencia de vello pubiano a los 6 meses
7	5 meses, V	A término	75/75%	—	Vello terminal largo y rizado en el escroto. Volumen testicular 1,5 ml	Dudosos	Dudosos

V: varón; M: mujer; D: derecha; I: izquierda.

## RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados. Los valores de LH, FSH, estradiol, DHEA-S, testosterona, delta-4-androstenediona, 17-hidroxiprogesterona y estrona estuvieron en la gama prepupal en todos los pacientes. La ecografía pélvica mostró unos ovarios de aspecto prepupal (volumen ovárico < 1,2 cm<sup>3</sup>) con útero no estimulado en todas las niñas. La edad ósea estuvo en ± 2 desviaciones estándar (DE) para la edad cronológica en todos los pacientes (tabla 1). Durante las visitas de seguimiento no hubo evidencia de progresión puberal ni de aceleración del crecimiento lineal en ninguno de los pacientes.

## DISCUSIÓN

Presentamos datos de 7 pacientes concebidos mediante TRA, de 5 a 21 meses de edad, remitidos para la evaluación endocrina de una posible pubertad precoz y que presentaron desarrollo mamario, vello pubiano o ambas circunstancias. Las pacientes que mostraron desarrollo mamario y vello pubiano fueron evaluadas respecto a la posibilidad de precocidad sexual. Los pacientes que presentaron principalmente vello pubiano también fueron evaluados respecto a causas de hiperandrogenismo, como la hiperplasia suprarrenal congénita. La evaluación endocrina mostró valores hormonales en la gama prepupal en todos los pacientes; la ecografía pélvica confirmó los ovarios prepupulares con úteros no estimulados. El seguimiento clínico de nuestros pacientes no reveló progresión del desarrollo mamario ni aumento de la pubarquia. La velocidad de crecimiento lineal siguió los canales de percentil.

Nuestros pacientes tuvieron una presentación clínica poco habitual. El tamaño y la maduración del tejido

glandular mamario de los lactantes concebidos mediante TRA y remitidos para la evaluación del desarrollo mamario fueron mayores que los observados habitualmente en nuestra población de pacientes con telarquia aislada, una alteración benigna, pero poco explicada, de los lactantes normales que puede provenir de un retraso de la transición del activo eje hipotálamo-hipofisario-gonadal fetal al prepupal, en reposo. El grado de tejido mamario observado en nuestros pacientes TRA, aislado o asociado con vello pubiano, planteó la posibilidad de una pubertad precoz, bien de mediación central o bien de origen ovárico o suprarrenal.

Según la historia clínica, una relación común entre este grupo de pacientes fue que todos habían sido concebidos mediante TRA. Todas las madres habían recibido r-FSH, r-hCG y progesterona según los protocolos estándar de TRA<sup>12-16</sup>. La revisión bibliográfica de la farmacocinética y la farmacodinamia de r-FSH y r-hCG indica que estos compuestos no pueden ser, de forma aislada, la causa de los hallazgos clínicos. Además, la cronología de la administración de ambas medicaciones para la inducción de la ovulación hace poco probable la existencia de un efecto directo de estos fármacos sobre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal fetal<sup>16</sup>.

Revisamos la bibliografía de la posible relación entre procedimientos TRA y la aparición de efectos androgénicos, estrogénicos o de ambos tipos, en el fruto. Datos recientes indican que las concentraciones maternas de βhCG en el suero y el líquido amniótico son elevadas en los embarazos concebidos mediante TRA<sup>17,18</sup>. Además, los embarazos gemelares por TRA presentan valores de βhCG mayores que los observados en los embarazos gemelares espontáneos. El aumento de βhCG se observa incluso en los embarazos que siguen a la transferencia de embriones congelados (TEC). Así, el aumento de βhCG no parece estar relacionado con el tratamiento

hormonal para la superovulación<sup>17,18</sup>. Aunque no podemos excluir otros factores, sospechamos que el aumento de  $\beta$ hCG materna observado en TRA puede desempeñar un papel etiológico. Se sabe que la  $\beta$ hCG placentaria induce la esteroidogénesis suprarrenal, materna y fetal, de DHEA<sup>18,19</sup>. Luego, el DHEA-S se convierte en delta-4-androstenediona en la placenta. El DHEA-S y delta-4-androstenediona son los principales precursores de la producción placentaria de estrógenos<sup>18,19</sup>. Los elevados valores de dehidroepiandrosterona y delta-4-androstenediona se metabolizan a estrógenos y andrógenos, que pueden incidir sobre el feto en desarrollo<sup>20-22</sup>. Suponemos que los elevados valores intrauterinos de estrógenos y andrógenos pueden mediar directamente en el desarrollo del tejido mamario y del vello pubiano y, además, pueden modificar la maduración del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en el feto en desarrollo.

Aunque la etiología del aumento de  $\beta$ hCG en los embarazos TRA es dudosa, sabemos que los valores maternos de  $\beta$ hCG en los embarazos gemelares son mayores que en los embarazos de feto único. Por tanto, es concebible que en nuestra población de pacientes los numerosos implantes de embriones al inicio del embarazo pueden constituir un factor que incremente los valores maternos de  $\beta$ hCG y modifique el medio hormonal maternofetal. Sin embargo, debemos advertir que un estudio no encontró elevación congruente con el número de implantaciones y la posterior reducción multifetal<sup>23</sup>. Además, tampoco conocemos el impacto de la fecundación artificial o del cultivo de embriones ni el efecto de la progesterona sobre el feto.

El impacto de un medio hormonal alterado sobre el feto en desarrollo es oscuro. Se sabe que la vida fetal constituye una etapa temprana e importante del desarrollo del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal que culmina en la vida adulta con la consecución de la maduración sexual completa y la fecundidad. Tanto en las personas como en los primates, el generador fetal de pulsos de hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica (GnRH) funciona en el feto al final del primer trimestre. Los estudios indican que la impregnación o programación hormonal ocurre, durante la vida fetal, en un período crítico de la maduración<sup>24</sup> y puede modular la expresión génica y los receptores nucleares, de la membrana plasmática, o de ambos tipos<sup>25</sup>. Hay pruebas de que los andrógenos prenatales programan la cronología de la pubertad neuroendocrina en la oveja; cuando mayor es la dosis prenatal de testosterona, más temprano el inicio del aumento puberal de LH<sup>26</sup>. Se ha demostrado que la administración de estrógenos a ratas gestantes durante el último tercio de la gestación provoca frutos macho con criptorquidia y puede suprimir de forma permanente la espermatogénesis en los machos adultos. Además, la administración perinatal de estrógenos al roedor hembra en desarrollo produjo efectos a largo plazo, consistentes en cornificación vaginal persistente, lesiones hiperplásicas vaginales y cáncer cervicovaginal; los estrógenos sintéticos no esteroideos (dietilestilbestrol) mostraron efectos similares<sup>25,27</sup>.

Sean cuales sean los mecanismos, las concentraciones de hormona en el feto modifican el sistema endocrino en desarrollo del feto y los sistemas de control endocrino. Los pacientes concebidos mediante TRA, incluyendo los nuestros, que presenten manifestaciones hormo-

nales deben ser controlados durante la infancia y la adolescencia hasta la edad adulta, para determinar el impacto, si existe, sobre la cronología de la pubertad y la posterior fecundidad.

Reconocemos las limitaciones de nuestro estudio. Nuestros datos representan la recopilación de nuestra experiencia en los lactantes TRA remitidos para la evaluación de signos clínicos de pubertad precoz. Pese a suponer que la elevación de la  $\beta$ hCG materna puede desempeñar un papel crucial en el desarrollo de un efecto hormonal en estos recién nacidos, no dispusimos de los valores maternos seriados de  $\beta$ hCG. Además, el número de lactantes TRA que presentan signos clínicos de pubertad es sumamente pequeño comparado con loscientos de recién nacidos concebidos mediante TRA en nuestra área de referencia. Estudios prospectivos, bien controlados, que incluyan la ecografía ovárica fetal, los valores hormonales en líquido amniótico y una evaluación meticulosa y sostenida del lactante TRA ofrecerán nuevos puntos de vista sobre el mecanismo de esta entidad en los lactantes concebidos mediante TRA.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la contribución del Dr. V.K. Prasad, Associate Director del Pediatric Endocrine Laboratory, en las determinaciones internas de hormonas esteroideas.

## BIBLIOGRAFÍA

- American Society for Reproductive Medicine; Society for Assisted Reproductive Technology Registry. Assisted reproductive technology in the United States: 1999 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril*. 2002;78:918-31.
- Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and very low birth weight in infants conceived with the use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med*. 2000;346:731-7.
- FIVNAT (French *In Vitro* National). Pregnancies and births resulting from *in vitro* fertilization. French national registry, analysis of data 1986 to 1990. *Fertil Steril*. 1995; 64:746-56.
- Bergh T, Ericson A, Hillensjo T, Nygren KG, Wennerholm UB. Deliveries and children born after *in vitro* fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. *Lancet*. 1999;354:1579-85.
- Hansen M, Kurinczuk J, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. *N Engl J Med*. 2002;346:725-30.
- Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. *In vitro* fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am J Hum Genet*. 2003; 72:1338-41.
- Klip H, Burger CW, De Kraker J, Van Leeuwen FE; OME-GA-project Group. Risk of cancer in the offspring of women who underwent ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod*. 2001;16:2451-8.
- Bruinsma F, Venn A, Lancaster P, Speirs A, Healy D. Incidence of cancer in children born after *in vitro* fertilization. *Hum Reprod*. 2000;15:604-7.
- Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, Van Leeuwen FE. Incidence of retinoblastoma in children born after *in vitro* fertilisation. *Lancet*. 2003;361:309-10.
- Manlimos F, Abraham GE. Chromatographic purification of tritiated steroids prior to use in radioimmunoassay. *Anal Lett*. 1975;8:403-10.

11. Greulich WW, Pyle SI. Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist. Stanford: Stanford University Press; 1959.
12. Rowell P, Braude P. Assisted conception. I. General principles. *BMJ*. 2003;327:799-801.
13. Rowell P, Braude P. Assisted conception. II. *In vitro* fertilisation and intracytoplasmic sperm injection. *BMJ*. 2003;327:852-5.
14. Daya S, Gunby J, Hughes EG, Collins JA, Sagle MA. Follicle-stimulating hormone *versus* human menopausal gonadotropin for *in vitro* fertilization cycles: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 1995;64:347-54.
15. Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P, Ciampaglia W. Choice of ovarian stimulation regimens in assisted reproduction: finding the thread in the gonadotropin maze. *Fertil Steril*. 2003;80:1114-6.
16. Le Cotonne JY, Loumaye E, Porchet HC, Beltrami V, Munafò A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between recombinant human luteinizing hormone and recombinant human folliclestimulating hormone. *Fertil Steril*. 1998;69:201-9.
17. Perheentupa A, Ruokonen A, Tuomivaara L, Ryynanen M, Martikainen H. Maternal serum beta-HCG and alpha-fetoprotein concentrations in singleton pregnancies following assisted reproduction. *Hum Reprod*. 2002;17:794-7.
18. Hui PW, Lam YH, Tang MH, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. Amniotic fluid human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein levels in pregnancies conceived after assisted reproduction. *Prenat Diagn*. 2003;23:484-7.
19. Braunstein G. Endocrine changes in pregnancy. En: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky K, editors. Williams textbook of endocrinology. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2003. p. 800-3.
20. Miller WL. Steroid hormone biosynthesis and actions in the maternofeto-placental unit. *Clin Perinatol*. 1998;25:799-817.
21. Vaskivuo TE, Aittomäki K, Anttonen M, et al. Effects of folliclestimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotropin in individuals with an inactivating mutation of the FSH receptor. *Fertil Steril*. 2002;78:108-13.
22. Barnes RB, Rosenfield RL, Namnoum A, Layman LC. Effect of folliclestimulating hormone on ovarian androgen production in a woman with isolated follicle-stimulating hormone deficiency. *N Engl J Med*. 2000;343:1197-8.
23. Rotmensch S, Celentano C, Shalev J, et al. Midtrimester maternal serum screening after multifetal pregnancy reduction in pregnancies conceived by *in vitro* fertilization. *J Assist Reprod Genet*. 1999;16:8-12.
24. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res*. 2002;57:2-14.
25. Csaba G. Receptor ontogeny and hormonal imprinting. *Experientia*. 1986;42:750-9.
26. Kosut SS, Wood RI, Herbose-Encarnacion C, Foster DL. Prenatal androgens time neuroendocrine puberty in the sheep: effect of testosterone dose. *Endocrinology*. 1997;138:1072-7.
27. Bern HA, Talamantes FJ Jr. Neonatal mouse models and their relation to disease in the human female. En: Herbst AL, Bern HA, editors. Developmental Effects of Diethylstilbestrol (DES) in Pregnancy. New York: Thieme-Stratton; 1981. p. 129-47.