



Comparación clínica de reproducción asistida y concepción espontánea en gemelos prematuros

Roxana Noriega-Alvarez,^a José Iglesias-Leboreiro,^a Isabel Bernardez-Zapata^a

Premature twins: clinic comparison, reproductive assisted techniques versus spontaneous conception

Background: Twin pregnancies occur one out of every 800. Due to the increase in maternal age and infertility, the use of assisted reproductive technology (ART) has risen. Thirty five percent of pregnancies solved using ART are twin pregnancies. ART consists of infertility treatments in which oocytes and sperm are manipulated. The objective of this study was to compare the clinical behavior of premature twins born through ART versus those born after spontaneous conception (SC).

Methods: Retrolective cohort study. The data was obtained from the records of preterm twins born between August 2010 and August 2013. Preterm twins were categorized in two groups: the ones conceived using ART versus those conceived through SC. Demographic characteristics and neonatal outcomes were compared.

Results: The total was of 398 patients: 208 conceived in consequence of ART and 190 through SC. The primary outcome and neonatal morbidities showed no significant difference, only the incidence of necrotizing enterocolitis and the use of parenteral nutrition showed significant difference. The length of hospital stay between groups was similar.

Conclusion: In our population of preterm twins, the mode of conception had no detectable effect on mortality or short term morbidities.

Keywords Palabras clave

| | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Twins | Gemelos |
| Infant, Premature | Prematuro |
| Reproductive techniques, Assisted | Técnicas reproductivas asistidas |
| Spontaneous conception | Concepción Espontánea |

El mundo de los gemelos

Los embarazos gemelares ocurren naturalmente en uno de cada 800 embarazos y los de trillizos en uno de cada 6400, pero se piensa que aproximadamente una octava parte de los embarazos naturales son en un inicio múltiples, con una pérdida espontánea de uno o más fetos. Dos tercios de los embarazos gemelares son dicigóticos y un tercio monocigóticos.^{1,2} La mortalidad en un embarazo único es de 10 por cada 1000 nacidos vivos y se incrementa a 53 por cada 1000 nacidos vivos en embarazos gemelares.^{3,4} Estos son más propensos a complicaciones con un riesgo elevado de hipertensión gestacional, diabetes gestacional, hemorragia posparto, aborto, prematuridad, restricción en el crecimiento intrauterino, malformaciones y transfusión fetofetal.^{1,5}

Debido al incremento en la edad materna y a la prevalencia de infertilidad en el mundo en desarrollo, las técnicas de reproducción asistida se han convertido en un suceso,^{6,7} y en los últimos años, con el incremento en el uso de estas, los embarazos gemelares han aumentado un 47 %.^{1,8} Se estima que son gemelares 1 % de los embarazos espontáneos y hasta 35 % de los embarazos por técnicas de reproducción asistida.^{9,10} Las técnicas de reproducción asistida se definen como tratamientos de infertilidad en los cuales tanto los oocitos como los espermatozoides son manipulados.^{11,12} Existen diferentes tipos: inducción de ovulación, donación de óvulo o espermia, selección espermática, fertilización *in vitro* (FIV), inyección espermática intracitoplasmática, inseminación intracervical, inseminación intrauterina, transferencia de gametos intratubáricos y transferencia de cigoto intratubárico.^{13,14} De acuerdo con la Sociedad de Reproducción Asistida (SART) el uso de estas técnicas ha incrementado en Estados Unidos de 64 681 ciclos en el año 1995 a 140 795 ciclos en el año 2008 y se estima que en el año 2015 serán realizados dos millones de ciclos a nivel mundial.^{15,16} El primer embarazo concebido por fertilización *in vitro* fue en el año 1977 por Louis Brown,^{17,18} y en el año 1981 se introdujeron las técnicas de reproducción asistida en Estados Unidos, por lo que se estima que un 18 % de los embarazos múltiples en este país son resultado de alguna técnica de reproducción asistida.^{11,4} Desde este evento, más

^aServicio de Neonatología, División de Pediatría, Hospital Español de México. Facultad de Medicina, Universidad La Salle

Distrito Federal, México

Comunicación: Roxana Noriega-Alvarez
Correo electrónico: noriegarox@gmail.com
Teléfono celular: (55) 5456 2548

Recibido: 28/03/2014

Aceptado: 10/06/2014

Introducción: los embarazos gemelares ocurren una vez cada 800 embarazos. Debido al incremento en la edad materna y a la prevalencia de la infertilidad ha aumentado el uso de las técnicas de reproducción asistida (TRA). De los embarazos resueltos por medio de estas técnicas, 35 % son gemelares. Las TRA se definen como tratamientos de infertilidad en los que oocitos y espermatozoides son manipulados. El objetivo de este estudio consistió en comparar el comportamiento clínico de los gemelos obtenidos por técnicas de reproducción asistida frente al de los gemelos obtenidos de manera espontánea.

Métodos: estudio de cohorte retrospectiva. La información se obtuvo de expedientes de pacientes gemelares

recién nacidos con 37 semanas de gestación o menos durante el periodo agosto 2010-2013. La población se dividió en dos grupos: los concebidos por técnicas de reproducción asistida (TRA) y los espontáneos (CE). Se compararon características demográficas y resultados neonatales.

Resultados: fueron en total 398 pacientes: 208 pacientes por TRA y 190 por CE. De las variables analizadas no existe diferencia significativa entre grupos, únicamente en enterocolitis necrozante y nutrición parenteral. El número de días de estancia intrahospitalaria por grupos no tuvo resultados significativos.

Conclusión: el modo de concepción no tuvo un efecto detectable en la mortalidad y la morbilidad neonatales.

Resumen

de tres millones de niños han nacido por fertilización *in vitro* o alguna técnica de reproducción asistida.^{9,5}

A pesar de los avances en medicina, la prematuridad continúa siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad infantil a nivel mundial.¹⁹ En Estados Unidos existe una tasa de prematuridad del 12.7 %, lo cual representa un incremento del 36 % en los últimos 25 años de acuerdo con un estudio realizado por la fundación March of Dimes.²⁰ Y en España existe una tasa de prematuridad del 8 %.²¹ Aunque existen muchos estudios en los que se relaciona a las técnicas de reproducción asistida con un riesgo aumentado de complicaciones perinatales y neonatales, se describe en estos que las características maternas y paternas causantes de infertilidad pueden contribuir por sí solas a estas complicaciones.²² Además, algunos autores no han observado una relación entre técnicas de reproducción asistida y un riesgo incrementado de prematuridad, peso bajo y admisiones a la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN).²³

El aumento en el número de embarazos múltiples en las últimas décadas tiene consecuencias médicas, éticas y económicas.¹ Aunque es conocido el riesgo de prematuridad en los embarazos múltiples, se ha encontrado que los embarazos únicos obtenidos por técnicas de reproducción asistida también presentan ese riesgo.²⁴

Para determinar la edad gestacional prenatal y postnatal existen varios métodos basados en la duración del embarazo, tamaño fetal, madurez física y neurológica, y ninguno de ellos es libre de fallas. El método más utilizado hasta el momento es la edad gestacional con base en la fecha de la última menstruación y un ultrasonido en la semana 20 de gestación. Los embarazos que se resuelven con técnicas de reproducción asistida ofrecen una oportunidad para la determinación exacta de la edad gestacional al utilizar las fechas de fertilización o implantación; sin embargo, a pesar de esta oportunidad, el índice de prematuridad y la estimación de edad gestacional continúan con fallas.¹⁸

Desde el auge observado en las técnicas de reproducción asistida y el incremento de embarazos múltiples que esto conlleva, se han desarrollado técnicas de reducción fetal selectiva, las cuales no se aplican en embarazos gemelares sino en embarazos con un número mayor de dos fetos; en un estudio realizado en Taiwán en el 2007 se demostró que los embarazos gemelares obtenidos por fetorreducción selectiva presentaron un índice de prematuridad y peso bajo mayor en comparación con aquellos obtenidos por embarazo gemelar inicial.²⁴

Entre las técnicas de reproducción asistida, la estimulación ovárica controlada, o inducción de ovulación, es la causa más importante de embarazos múltiples relacionados con el tratamiento de infertilidad en Estados Unidos, pues corresponde a una tercera parte de estos.²⁵

En nuestro país, como en el resto del mundo, año con año se da un incremento importante en el uso de técnicas de reproducción asistida, lo cual ha llevado a un incremento exponencial en la incidencia de embarazos múltiples (que incluye gemelos, trillizos o más).

Esta realidad tiene como consecuencia directa un aumento en el número de nacimientos prematuros, sean consecuencia directa de las técnicas de reproducción o de las enfermedades subyacentes de los padres, por lo que es importante tomar en consideración ambas al momento de determinar el comportamiento clínico de estos pacientes y establecer si existe una diferencia en el comportamiento clínico de los gemelos obtenidos de manera espontánea frente a aquellos obtenidos por medio de reproducción asistida.

Los embarazos gemelares obtenidos por técnicas de reproducción asistida son una realidad en aumento exponencial, por lo que existe evidencia a favor o en contra en cuanto a que el comportamiento clínico de estos difiere en comparación con el de los gemelos obtenidos de manera espontánea.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo consistió en determinar si el comportamiento clínico de los gemelos

los obtenidos por técnicas de reproducción asistida difiere del comportamiento clínico de los gemelos obtenidos de manera espontánea. Asimismo, tenemos como hipótesis verdadera que los gemelos obtenidos de manera espontánea presentan un comportamiento clínico con menores morbilidades que los obtenidos por técnicas de reproducción asistida. Y nuestra hipótesis nula es la siguiente: los gemelos obtenidos de manera espontánea no presentan un comportamiento clínico con menores morbilidades que los obtenidos por técnicas de reproducción asistida.

Métodos

Se condujo un estudio de centro único de tipo cohorte retrolectiva en el Hospital Español de México, el cual es un centro de tercer nivel. Cabe aclarar que todos los pacientes nacieron en esta institución.

La información se obtuvo de manera retrospectiva de expedientes de todos los pacientes recién nacidos menores de 37 semanas de gestación, obtenidos por embarazos gemelares durante el periodo de agosto de 2010 a agosto de 2013.

La población en estudio se conformó por recién nacidos pretérmino gemelares menores de 37 semanas de gestación. Los pacientes fueron divididos en dos grupos: aquellos concebidos por técnicas de reproducción asistida (TRA) y aquellos concebidos de manera espontánea (CE).

El tamaño de muestra se calculó utilizando la fórmula de John McCall para variables numéricas con un error alfa de 5 % y un error beta de 20 %. Con datos de bibliografía, se tomó en cuenta el peso al nacimiento: 1099 gramos con una desviación estándar (DE) de 391 gramos en el grupo TRA y 1213 gramos con una DE de 375 gramos en el grupo CE. Se encontró que cada grupo de esta muestra debió ser mínimo de 178 pacientes con un total de 356 pacientes.

Como variables primarias se tomaron en cuenta un compuesto de mortalidad y morbilidades neonatales: hemorragia intraventricular, retinopatía del prematuro (ROP), broncodisplasia pulmonar (BDP), reflujo gastroesofágico (RGE), alteraciones neurológicas somatosensoriales (resultados de potenciales evocados somatosensoriales, auditivos y visuales, y emisiones otoacústicas).

Como variables secundarias se incluyeron componentes individuales de las variables primarias, ventilación mecánica con presión positiva, días de estancia intrahospitalaria en la UCIN, incidencia de sepsis neonatal temprana, sepsis neonatal tardía, hipoglucemia, hiperbilirrubinemia, enterocolitis necrosante (ECN) y uso de nutrición parenteral.

La edad gestacional fue definida de acuerdo con el historial obstétrico. Un recién nacido fue definido como pequeño para edad gestacional si el peso al nacimiento se encontró por debajo del percentil 3 de acuerdo con las gráficas modificadas de Fenton.²⁶

Asimismo, la mortalidad fue definida como muerte antes del alta de la UCIN.

Se determinó que tenían BDP aquellos pacientes con 36 semanas de edad gestacional corregida, aun con aporte de oxígeno suplementario en cualquier modalidad. La hemorragia intraventricular se diagnosticó por medio de ultrasonido transfontanelar con base en los criterios de Papile. La ECN se definió de acuerdo con los criterios de Bell. Se definió sepsis neonatal temprana en aquellos pacientes con antecedente de potencial infección por parte de la madre, como ruptura prematura de membranas mayor de 18 horas o criterios de corioamnioitis y aislamiento de organismo tomado de un cultivo estéril (orina, líquido cefalorraquídeo o sangre) en la primeras setenta y dos horas de vida. Además, se definió sepsis neonatal tardía cuando había datos de respuesta inflamatoria sistémica o aislamiento de organismo tomado de un cultivo estéril (orina, líquido cefalorraquídeo o

Cuadro I Características neonatales de los 398 pacientes gemelares

| Variable | Técnicas de reproducción asistida (TRA) | | Concepción espontánea | | p |
|-------------------------------|---|------|-----------------------|------|-------|
| | (n = 208) | | (n = 190) | | |
| Edad gestacional (semanas) | 33 (2.43) | | 33 (2.15) | | 0.601 |
| Peso al nacimiento (g) | 1933 (415) | | 1880 (455) | | 0.301 |
| | n | % | n | % | |
| Masculino | 97 | 46.6 | 83 | 43.6 | 0.057 |
| Pequeño para edad gestacional | 40 | 16.1 | 32 | 16.8 | 0.603 |
| Cesárea [n(%)] | 208 | 100 | 188 | 98.9 | 0.227 |
| Apgar (1 min) | 9 (4-9) | | 9 (3-9) | | 0.014 |
| Apgar (5 min) | 9 (6-10) | | 9 (6-10) | | 0.252 |

*Los resultados se presentan como media (DE) o mediana (rango) o número [n(%)] apropiadamente

sangre) después de los siete días de vida. La hiperbilirrubinemia se definió de acuerdo con bilirrubinas séricas y con las gráficas de la Royal College of Obstetricians and Gynaecologists del 2010, según los días de vida y edad gestacional. La hipoglicemia se definió como medición de glucosa capilar menor de 50 mg/dL durante la estancia intrahospitalaria del paciente en la UCIN. La retinopatía del prematuro se definió de acuerdo con la clasificación internacional. El reflujo gastroesofágico se definió a partir del resultado de una serie gastroduodenal o pehachimetría positiva para reflujo gastroesofágico.

Se compararon características demográficas y resultados neonatales entre grupos utilizando χ^2 o *t* test de Fisher para datos categóricos y *t* de Student para datos continuos.

Se reportó un intervalo de confianza del 95 % como adecuado. Se realizó el análisis estadístico utilizando el programa SPSS 17.0. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

Resultados

Un total de 398 pacientes nacieron en el Hospital Español de México. Fueron producto de embarazos gemelares durante el periodo de agosto de 2010 a agosto de 2013. Fueron concebidos doscientos ocho

pacientes (104 madres) por medio de TRA, y 190 (95 madres) mediante CE.

De los 398 pacientes, 286 ingresaron a la UCIN; 150 (72.2 %) correspondieron al grupo de TRA y 136 (71.6 %) al grupo de CE con una $p > 0.05$.

No hubo diferencia significativa entre ambos grupos en el promedio de edad gestacional y el peso al nacimiento (cuadro I). Tampoco la hubo en relación con mortalidad, incidencia de hemorragia intraventricular, hipoglucemia, sepsis neonatal temprana, hiperbilirrubinemia y la necesidad de ventilación mecánica, pues fue similar en ambos grupos (cuadro II).

La incidencia de sepsis neonatal tardía, ECN y el uso de nutrición parenteral TRA frente a CE, respectivamente, tuvo un valor de p estadísticamente significativo (cuadro II).

La incidencia de morbilidades como BDP, retinopatía del prematuro (ROP), RGE y alteraciones neurológicas por el resultado de potenciales evocados somatosensoriales, auditivos y visuales fue similar en ambos grupos; únicamente el resultado de emisiones otoacústicas alteradas fue significativamente mayor en el grupo de TRA.

Se dividió a la población de UCIN por grupos, según la edad gestacional. Se excluyó a los pacientes trasladados a otras instituciones y a los que fallecieron para estimar el promedio de días de estancia intrahos-

Cuadro II Resultados neonatales de los 398 pacientes gemelares

| Variables | Técnicas de reproducción asistida (TRA) (<i>n</i> = 208) | | Concepción espontánea (<i>n</i> = 190) | | <i>p</i> | Riesgo relativo | IC 95 % |
|-----------------------------|--|------|--|------|----------|-----------------|--------------|
| | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | | | |
| Mortalidad | 3 | 1.4 | 5 | 2.6 | 0.487 | 0.548 | 0.105-2.591 |
| Hemorragia intraventricular | 9 | 4.3 | 11 | 5.7 | 0.647 | 0.747 | 0.290-1.902 |
| Hipoglucemia | 76 | 36.3 | 68 | 35.6 | 0.917 | 1.020 | 0.776-1.346 |
| Hiperbilirrubinemia | 105 | 50.2 | 111 | 58.1 | 0.131 | 0.864 | 0.717-1.045 |
| Sepsis temprana | 79 | 37.9 | 62 | 32.6 | 0.295 | 1.164 | 0.879-1.546 |
| Sepsis neonatal tardía | 40 | 19.2 | 22 | 11.5 | 0.038 | 1.661 | 1.001-2.797 |
| Ventilación mecánica | 34 | 16.3 | 20 | 10.5 | 0.147 | 1.553 | 0.900-2.716 |
| ECN | 41 | 19.6 | 23 | 12 | 0.041 | 1.628 | 0.990-2.710 |
| NPT | 50 | 24 | 26 | 13.1 | 0.010 | 1.757 | 1.119-2.797 |
| Morbilidades | | | | | | | |
| BDP | 20 | 9.5 | 10 | 5.2 | 0.128 | 1.827 | 0.837-4.109 |
| ROP | 7 | 3.3 | 3 | 1.5 | 0.343 | 2.131 | 0.506-10.325 |
| RGE | 11 | 5.2 | 14 | 7.3 | 0.416 | 0.718 | 0.310-1.641 |
| Potenciales evocados | 38 | 39.5 | 23 | 28.7 | 0.154 | 1.377 | 0.880-2.196 |
| Emisiones otoacústicas | 25 | 31.6 | 14 | 17.5 | 0.440 | 1.807 | 0.98-3.43 |

*Los resultados se presentan como media (DE) o mediana (rango) o número [N(%)] apropiadamente

ECN = enterocolitis necrosante; NPT = nutrición parenteral; BDP = broncodisplasia pulmonar; ROP = retinopatía del prematuro; RGE = reflujo gastroesofágico

Cuadro III Días de estancia en la unidad de cuidados intensivos neonatales de 269 pacientes gemelares

| Semanas de gestación (SDG) | Técnicas de reproducción asistida (TRA) (n = 140) | Concepción espontánea (n = 129) | p |
|----------------------------|---|---------------------------------|-------|
| 28-29.6 | 73.3 días (31.2) | 59.5 días (10.5) | 0.170 |
| 30-31.6 | 42.3 días (14.3) | 48.8 días (8.1) | 0.195 |
| 32-33.6 | 25.8 días (13.4) | 26.5 días (14.6) | 0.838 |
| 34-36.6 | 14.2 días (9) | 13.6 días (8.9) | 0.371 |

*Los resultados se presentan como promedio (DE)

pitalaria y en ninguno de los grupos (TRA frente a CE) hubo diferencia significativa (cuadro III).

En nuestro estudio el modo de concepción no influyó en la mortalidad y morbilidad neonatal en pacientes producto de embarazos gemelares pretérmino menores de 37 semanas de gestación.

Nuestros resultados son consistentes con otros estudios utilizados como referencia en nuestra bibliografía.^{2,4,17}

La tasa de cesáreas no fue diferente entre ambos grupos como se reporta en la literatura.¹⁷

Entre nuestros hallazgos, la incidencia de ECN y el uso de nutrición parenteral tuvieron un nivel más alto y fueron estadísticamente significativos, lo cual debe tomarse en cuenta; sin embargo, en la literatura esto no se encuentra documentado.

El mecanismo preciso de reproducción asistida que se utilizó no fue aclarado ni la causa subyacente de infertilidad, por lo que sería conveniente tomar esto en consideración para un estudio futuro.

Existen varias limitaciones en nuestro estudio. Una es la posibilidad de que las madres del grupo de CE hayan recibido agentes inductores de estimulación hormonal sin reportarlo, lo cual afectaría la hipótesis nula (sin diferencia en comportamiento clínico entre grupos).

No se evaluó la influencia de la corionicidad, ya que no se encuentra reportada en los expedientes de los pacientes o en los maternos, respectivamente.

A pesar de las limitantes, nosotros creemos que la información de este estudio tiene implicaciones clínicas.

Con el fin de reducir el riesgo de embarazos múltiples, es vital el consejo prenatal informado de los riesgos implicados y los embriones transferidos por ciclo.

El éxito de la intervención de las técnicas de reproducción asistida debe ser cuantificado en términos de la evolución materna y neonatal en lugar de únicamente considerar el número de embriones sobrevivientes de cada procedimiento realizado.

Conclusiones

En nuestra población de gemelos menores de 37 semanas de gestación, el modo de concepción no influyó en la tasa de mortalidad o en morbilidades.

Sería interesante realizar, a largo plazo, un trabajo de estos pacientes en cuanto a neurodesarrollo y ampliar la línea de tiempo.

Asimismo sería interesante comparar cada método de reproducción asistida de manera individual.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno en relación con este artículo.

Referencias

- Corsello G, Piro E. The world of twins: an update. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Oct;23 Suppl 3:59-62. doi: 10.3109/14767058.2010.508218.
- Yang H, Choi YS, Nam KH, Kwon JY, Park YW, Kim YH. Obstetric and perinatal outcomes of dichorionic twin pregnancies according to methods of conception: Spontaneous versus in-vitro fertilization. *Twin Res Hum Genet.* 2011 Feb;14(1):98-103. doi: 10.1375/twin.14.1.98.
- Antsaklis A, Anastasakis E. Selective reduction in twins and multiple pregnancies. *J Perinat Med.* 2011 Jan;39(1):15-21. doi: 10.1515/JPM.2010.114. Epub 2010 Dec 8.
- Daniel Y, Ochshorn Y, Fait G, Geva E, Bar-Am A, Lessing JB. Analysis of 104 twin pregnancies conceived with assisted reproductive technologies and 193 spontaneously conceived twin pregnancies. *Fertil Steril.* 2000 Oct;74(4):683-9.
- Ochsenkuhn R, Strowitzki T, Gurtner M, Strauss A, Schulze A, Hepp H et al. Pregnancy complications, obstetric risks, and neonatal outcome in singleton and twin pregnancies after GIFT and IVF. *Arch Gynecol Obstet.* 2003. 268:256-61. DOI 10.1007/s00404-003-0518-5.
- Janvier A, Spelke B, and Barrington K. The epidemic of multiple gestations and neonatal intensive care unit use: The cost of irresponsibility. *J Pediatr.* 2011;159:409-413. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.02.017.

7. Allen-Merritt A, Lavery A, June-Anne G, Robin C, and Oshiro B. Assisted reproductive technologies: The need for multi-disciplinary review of its impact on neonatal/perinatal medicine and medical genetics. *Neoreviews* 2013; 14:e360-e368; doi:10.1542/neo.14-7-e360.
8. Wisborg K, Ingerslev HJ, and Brink-Henriksen T. In vitro fertilization and preterm delivery, low birth weight and admission to the neonatal intensive care unit: a prospective follow-up study. *Fertil Steril*. 2010 Nov;94(6):2102-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.01.014.
9. Sims ME. Legal briefs: The misfortune of monozygotic twins. *Neoreviews*. 2013;14:e262-e264.
10. Angelo D, Whitehead N, Helms K, Barfield W, and Ahluwalia I. Birth outcomes of intended pregnancies among women who used assisted reproductive technology, ovulation stimulation, or no treatment. *Fertil Steril*. 2011 Aug;96(2):314-320.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.073.
11. Boulet S, Schieve L, Nannini A, Ferre C, Devine O, Cohen B, et al. Perinatal outcomes of twin births conceived using assisted reproduction technology: a population-based study. *Hum Reprod*. 2008;23:1941-8. doi:10.1093/humrep/den169.
12. Pinborg A, Loft A, Schmidt L, Langhoff-Roos J, and Andersen A. Maternal risks and perinatal outcome in a Danish national cohort of 1005 twin pregnancies: the role of in vitro fertilization. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004 Jan;83(1):75-84
13. Cowan, J., & Demmer, L. Assisted reproductive technology and preimplantation genetic diagnosis: Impact on the fetus and newborn. *Neoreviews* March 2007; 8:e127-e132; doi:10.1542/neo.8-3-e127
14. Shah V, Alwassia H, Shah K, Yoon W, and Shah P. Neonatal outcomes among multiple < 32 weeks gestational age: Does mode of conception have an impact? *BMC Pediatr*. 2011 Jun 14;11:54. doi: 10.1186/1471-2431-11-54.
15. Bromer J, Ata B, Seli M, Lockwood C, Seli E. Preterm deliveries that result from multiple pregnancies associated with assisted reproductive technologies in the USA: a cost analysis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011;23:168-73.
16. Dickey R, Xiong X, Gee R, and Pridjian G. Effect of maternal height and weight on risk of preterm birth in singleton and twin births resulting from in vitro fertilization: a retrospective cohort study using the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System. *Fertil Steril*. 2012 Feb;97(2):349-54. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.017.
17. Weghofer A, Klein K, Stammli-Safar M, Barad D, Worda C, Husslein P, et al. Severity of prematurity risk in spontaneous and in vitro fertilization twins: does conception mode serve as a risk factor? *Fertil Steril*. 2009 Dec;92(6):2116-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.087.
18. Weghofer A, Klein K, Stammli-Safar M, Worda C, Barad D, Husslein P, et al. Can prematurity risk in twin pregnancies after in vitro fertilization be predicted? A retrospective study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:136.
19. Beydoun H, Ugwu B, and Oehninger S. Assisted reproduction for the validation of gestational age assessment methods. *Reproductive BioMedicine Online*. 2011;22:321-6. DOI:10.16/j.rbmo.2010.12.003
20. Lee K. Fertility treatments and the cost of a healthy baby. *Nursing for womens health*. 2011;15(1):15-18.
21. Barri P, Cololeu B, Clua E, Tur R. Prevention of prematurity by single embryo transfer. *J Perinat Med*. 2011;39:237-40. DOI 10.1515/JMP.2010.020
22. Nelson S, Lawlor D. Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilization: A prospective study of 144,018 treatment cycles. *Plos Med*. 2011;8:e1000386
23. Morcel K, Lavoue V, Beuchee A, Le Iannou D, Poulain P, Pladys P. Perinatal morbidity and mortality in twin pregnancies with dichorionic placentas following assisted reproductive techniques or ovarian induction alone: a comparative study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2010; 153:138-142.
24. Chong CU, Huang LS, Lee TH, Liu CH, Shih YT, Lee MS. A comparison of the outcomes between twin and reduced twin pregnancies produced through assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2007 Jul;88(1):47-52. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.11.084.
25. Ombelet W, Martens G, De-Sutter P, Gerris J, Bosmans E, Ruysinck G, et al. Perinatal outcome of 12,021 singleton and 3,108 twin births after non-IVF-assisted reproduction: a cohort study. *Hum Reprod*. 2006 Apr;21(4):1025-32. DOI:10.1093/humrep/dei419.
26. Fenton TR. A new growth chart for preterm babies: Babson and Brenda's chart updated with recent data and a new format. *BMC Pediatr*. 2003 Dec 16;3:13.