

## Importancia de los niveles de Ghrelina, estado nutricional y BMI como marcadores predictivos de embarazo en un programa de FIV (fertilización *in vitro*)

Luciano Sabatini, Edgardo Young (H), Roberto Inza, Dante Paz, Guillermo Marconi, Eduardo Lombardi

Reproducción 2009; 24:51-55

### Introducción

Desde hace tiempo la bibliografía describe a nivel mundial la relación que existe entre el estado nutricional y la función reproductiva.<sup>1</sup> De hecho, la mujer presenta mayores reservas de tejido adiposo que el hombre, destinadas a ser utilizadas durante el embarazo.<sup>2</sup>

Tanto en estados de déficit de peso como así también en los casos de exceso el organismo se vale de mecanismos que intentan impedir la gestación, ya que de producirse ésta se transformaría en un embarazo de alto riesgo materno-fetal debido al estado metabólico alterado de estas pacientes.<sup>3</sup>

Con el avance de la medicina muchos de estos mecanismos se han aclarado y es conocida la relación que existe entre la obesidad y la reproducción, en donde el ovario poliquístico, la hiperinsulinemia y la leptina actúan a nivel ovárico y extraovárico.

Pero es poco lo que se conoce acerca de los mecanismos intervinientes en pacientes que presentan bajo peso.<sup>3-4</sup>

Hace poco más de 9 años se descubrió una nueva citokina capaz de unirse y estimular a los receptores de la hormona de crecimiento, de allí esta hormona hereda el nombre de Ghrelina.<sup>5</sup> La Ghrelina es un péptido de 28 aminoácidos que es secretada principalmente por el estómago y el intestino delgado.<sup>5-6-7</sup>

Desde su descubrimiento, comenzó a estudiarse la relación que existe entre esta citokina y

la regulación de numerosas funciones endocrinas y paracrinas.<sup>5</sup> De hecho, la Ghrelina no solo muestra una fuerte interacción con la hormona de crecimiento, sino también tiene una importante asociación con la ingesta de alimentos y el balance energético.<sup>8</sup>

Se conocen en la actualidad 2 tipos de receptores de Ghrelina que se encuentran ampliamente distribuidos en todo el organismo: intestino, páncreas, riñón, placenta, tejidos linfáticos, gónadas, tiroides, suprarrenal, pulmón, hipófisis e hipotálamo.<sup>5-6</sup>

Desde el punto de vista energético, esta citokina posee acciones totalmente antagónicas a la Leptina. Es por ello que sus niveles plasmáticos son bajos en aquellas pacientes con obesidad y PCO, y por el contrario, se encuentran muy elevados en aquellas mujeres que tienen un BMI disminuido.<sup>9</sup> Sobre la base de su acción como modulador del metabolismo energético y la estrecha relación que existe entre el estado nutricional y la función reproductiva, se ha comenzado a estudiar el control local y sistémico de la Ghrelina sobre el eje gonadal.

Al parecer concentraciones elevadas de esta hormona repercutirían negativamente a lo largo del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal.<sup>10</sup>

Se ha comprobado que la Ghrelina en concentraciones elevadas altera la pulsatilidad de la secreción de GnRh a nivel hipotalámico, regula la secreción de LH y en menor medida de FSH en la hipófisis.<sup>11</sup> A nivel ovárico los receptores de Ghrelina presentan un patrón de expresión característico, siendo máximo durante la fase media y lútea del ciclo menstrual. Ghizzoni y col demostraron *in vitro* cómo esta citokina repercutía negativamente en la esteroideogénesis ovárica.<sup>12</sup> A nivel endo-

metrial guarda un patrón de expresión similar al ovárico, es decir, su expresión es máxima durante el período de ventana, cumpliendo un aparente rol en la formación del endometrio decidual.<sup>13</sup> Los niveles elevados no repercutirían solo en la mujer. En el hombre altera la producción y secreción de testosterona<sup>14</sup> y en embriones de ratones produce una inhibición del desarrollo embrionario, disminuyendo el número de células del citotrofoblasto y del macizo celular interno.<sup>15</sup>

Los avances en el conocimiento de esta hormona han permitido plantear que la elevación de Ghrelina sería uno de los mecanismos con los que cuentan los seres vivos para impedir que se produzca un embarazo en pacientes que orgánicamente no estarían preparadas para poder llevarlo adelante.<sup>9</sup>

### Objetivos

El objetivo principal de nuestro trabajo fue comparar la relación que existe entre los niveles plasmáticos de Ghrelina y el BMI con los resultados reproductivos de pacientes que realizaron tratamientos de alta complejidad en nuestro instituto. El objetivo secundario fue correlacionar los niveles de Ghrelina en plasma con los de líquido folicular.

Diseño: Estudio prospectivo, descriptivo.

Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado antes de iniciar la hiper-estimulación ovárica controlada, y el trabajo fue evaluado y aprobado por el comité de ética del IFER.

### Materiales y métodos

Se analizaron 492 procedimientos de alta complejidad realizados en el IFER entre el 5 de junio de 2007 y el 28 de diciembre de 2007. Se reclutaron así 39 pacientes que cumplieron con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

1. Indicación de un tratamiento de alta complejidad, sea FIV o ICSI.
2. BMI < 26.
3. Ritmos menstruales conservados.
4. FSH basal <12.
5. Edad < 40 años.

Criterios de exclusión:

1. Factor masculino severo.
2. Síndrome de ovario poliquístico o insulinore-sistencia.
3. Antecedente de falla previa de fertilización *in vitro*.

Criterios de eliminación:

Se eliminaron del estudio pacientes con transferencias embrionarias que no fueran clase A.

### Protocolo de estimulación

Todas las pacientes utilizaron un protocolo flexible de antagonistas de la GnRh. Se administró FSHr (Gonal<sup>®</sup>-Serono) en dosis de 200-300UI/día subcutánea durante los 3 primeros días de estímulo, continuando con HMG (Menopur<sup>®</sup>-Ferring) en dosis de 225-300UI/día subcutánea. Cuando el tamaño folicular alcanzaba un diámetro promedio de entre 15-16mm se indicaba (Cetrotide<sup>®</sup>-Serono) 0.25UI/día subcutánea. Al hallar, mediante ecografía transvaginal, 2 o más folículos mayores a 18mm se indicaba HCG (Gonacor<sup>®</sup>-Ferring) 10.000UI subcutánea; realizando la captación ovular bajo anestesia 34-36 hs después.

### Dosaje de Ghrelina en plasma y líquido folicular

A todas las pacientes se les realizó una extracción de 5cc de sangre venosa previo a la punción. La misma fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos. El plasma de todas las muestras se congeló a una temperatura de -5°C para su posterior utilización.

Del mismo modo se centrifugó y congeló el líquido folicular libre de lavado obtenido de la punción del folículo dominante.

Sobre el suero sanguíneo de todas las pacientes se realizó dosaje de Estradiol y Progesterona con *kits* de quimio-luminiscencia prolongada (Johnson & Johnson<sup>®</sup>). Se midieron niveles de Ghrelina en plasma y en líquido folicular con los *kits* de ELISA (Phoenix Pharmaceuticals<sup>®</sup>, Belmont, CA, USA).

### Procedimientos de laboratorio

Luego de la captación los ovocitos fueron fertilizados mediante inseminación convencional o a través de la inyección intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI).

La fertilización fue leída a las 16-18 hs posteriores a la inseminación y fue considerada como normal solamente cuando los 2 pronúcleos se observaron en forma clara. Los embriones fueron mantenidos en cultivos P1 (Irving Scientific), suplementado con 5 % de CO<sub>2</sub> y a 37° hasta día 2 ó 3 según correspondiera. La clasificación embrionaria realizada para elegir los embriones a transferir se basó en la apariencia morfológica microscópica de los mismos.

**Transferencia embrionaria y soporte de fase lútea**

La transferencia embrionaria fue llevada a cabo en D2 o D3 según correspondiera, en todos los casos con guía ecográfica y con un mínimo de 2 hs de retención de orina. En todos los casos se utilizaron cateters *soft* tipo Frydman®, quedando excluidas todas aquellas pacientes que presentaran dificultades técnicas al momento de realizarlo.

El soporte de fase lútea se realizó con Progesterona micronizada (Utrogestan®-Ferring) 600mg/día y Ácido acetil-salicílico 125 mg/día hasta obtener el resultado en sangre de la subβ HCG y manteniéndola durante el primer trimestre en los casos de embarazo.

**Análisis estadístico**

Los datos estadísticos analizados incluyen: la edad, BMI, etiología, FSH basal, número de folículos, número de ovocitos captados, número de ovocitos metafase II, calidad embrionaria, promedio de embriones transferidos, tasa de implantación, de embarazo clínico, de aborto y de embarazo ectópico. El embarazo clínico fue definido mediante la visualización ecográfica de un embrión con latido cardíaco positivo.

El programa de estadística con el que se trabajó fue el STATA, utilizando el Student *t-test*,  $\chi^2$  y estudio de las dos proporciones según corresponda. Los resultados fueron considerados significativos cuando la  $p < 0,05$ .

**Resultados**

Las 39 pacientes que cumplían los criterios de inclusión fueron divididas en 2 grupos: Grupo A (19), que presentaban un BMI < 19 (16.57 ± 1.01), y Grupo B (20) con un BMI entre 20-25

(23.15 ± 2.03). El tipo y la causa de infertilidad, como así también la edad, fue comparable en ambos grupos como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1**

	BMI < 19 (19)	BMI 20-25 (20)	P
<b>Edad</b>	34.05 (4.06)	33.65 (2.77)	NS
<b>Esterilidad 1°</b>	68% (13/19)	65% (13/20)	NS
<b>Esterilidad 2°</b>	32% (6/13)	35% (7/20)	NS
<b>Etiología</b>			
<b>FTP</b>	6	6	NS
<b>EDT</b>	7	6	NS
<b>FM leve-mod</b>	3	5	NS
<b>ESCA</b>	2	2	NS
<b>Otros</b>	1	1	NS

En cuanto a los resultados reproductivos, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de FSH basal, número de ovocitos captados, número de ovocitos metafase II, tasa de fertilización y número de embriones transferidos, como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2**

	BMI < 19 (19)	BMI 20-25 (20)	P
<b>FSH Basal</b>	6.47 ± 1.30	6.8 ± 1.43	NS
<b>Ovocitos Captados</b>	12.94 ± 5.94	13.5 ± 5.95	NS
<b>Ovocitos MII</b>	8.42 ± 3.33	9.25 ± 4.67	NS
<b>Tasa Fertilización</b>	6.36 ± 2.92 75%	7.4 ± 2.83 80%	NS
<b>Embriones Transferidos</b>	2.84 ± 0.76	2.85 ± 0.48	NS

La tasa de implantación, a pesar de no mostrar una diferencia desde el punto de vista estadístico, refleja una tendencia a favor del grupo de pacientes con un BMI normal (Grupo A 12% vs 33% Grupo B). La tasa de embarazo clínico fue significativamente mayor en pacientes con peso normal (Grupo A 26% vs 65% en Grupo B). La calidad embrionaria y el número de embarazo doble no mostraron diferencias entre ambos grupos en estudio. La tasa de aborto fue mayor en el grupo de pacientes con BMI 20-25 (Grupo A 5% vs 10% Grupo B), (Tabla 3).

En cuanto a los datos del laboratorio bioquímico, las pacientes con bajo peso presentaron

valores de Estradiol y Progesterona del día de la punción significativamente menores a los hallados en pacientes con peso normal (Grupo A 823.52 y 9.8 vs 1317.35 y 17.04 Grupo B).

Una mención especial merece el dosaje de Ghrelina en plasma, siendo estadísticamente superior en aquellas pacientes con un BMI <19 comparado con las pacientes que tuvieron una BMI normal ( $2.38 \pm 0.63$  vs  $0.47 \pm 0.24$  respectivamente), (Tabla 3).

Por último, se midió Ghrelina en el líquido folicular, libre de lavado, en 19 pacientes y se compararon sus resultados a los hallados en el plasma de las mismas pacientes, constatándose que existe una correlación lineal entre los resultados de plasma y fluido folicular.

**Tabla 3**

	BMI < 19 (19)	BMI 20-25 (20)	P
<b>Tasa Implantación</b>	12% (7/54)	33% (18/54)	NS
<b>Tasa Embarazo</b>	26% (5/19)	65% (13/20)	<0.05
<b>Calidad Embrionaria</b>	Clase IV 28% III 46%	IV 32% III 49%	NS NS
<b>Estradiol plasmático</b>	$823.52 \pm 501.54$	$1317.35 \pm 661.59$	<0.05
<b>Progesterona plasmática</b>	$9.8 \pm 5.85$	$17.04 \pm 10.14$	<0.05
<b>Ghrelina Plasmática (ng/ml)</b>	$2.38 \pm 0.63$	$0.47 \pm 0.24$	<0.05

## Discusión

La bibliografía mundial es muy extensa en la descripción de la alteración de parámetros reproductivos en pacientes obesas y poco hay descripto acerca de las alteraciones que presentan pacientes muy delgadas en las que la Ghrelina parece ser uno de los principales mediadores.<sup>5-6</sup>

Ya en el año 1977 Frisch hacía mención de la importancia que tiene el estado nutricional en el ser humano.<sup>1</sup> Él afirmaba que cuando se rompía este equilibrio metabólico, sea hacia el déficit o bien hacia el exceso, el propio organismo utiliza, a diferentes niveles, mecanismos que intentan impedir la concepción y el desarrollo de un embarazo.<sup>1-2</sup> Es conocido también que la mujer a diferencia del hombre presenta un 10% más de tejido graso en la distribución de su peso corporal, justamente destinado a ser utilizado para afrontar

un estado hipermetabólico como lo es un embarazo.<sup>2</sup> Además, una adolescente requiere como mínimo un 17% de tejido graso para iniciar su menarca y un 22% para poder mantener sus ciclos menstruales de manera adecuada durante la edad reproductiva.<sup>3</sup> Todos estos datos reflejan la relación que existe entre el estado nutricional y la función reproductiva.

Con el avance estrepitoso de la ciencia hoy podemos conocer y comprender algunos de aquellos mecanismos que hace 30 años Frisch comentaba; como lo es la Leptina, el neuropéptido Y, el Cortisol y la Ghrelina entre los más importantes. La intención de nuestro trabajo fue poder describir lo que hallamos en dos grupos de pacientes con diferente estado nutricional y que realizaron tratamientos de alta complejidad para conseguir su embarazo.

Como ya mencionamos en la introducción la Ghrelina es una hormona que se encuentra elevada en pacientes que presentan un BMI bajo y esta elevación repercute en el eje hipotálamo-hipofisogonadal.<sup>5-6</sup> En concordancia con la bibliografía el grupo de pacientes con menor peso presentó niveles de Ghrelina estadísticamente superiores respecto del grupo con BMI 20-25. Además, este reporte demuestra por primera vez la presencia de esta citokina en líquido folicular, ya que hasta ahora solo se suponía por la presencia de sus receptores en las diferentes células que componen el ovario. Ghizzoni y col describió cómo niveles progresivamente elevados de Ghrelina, en un cultivo de células de la granulosa, provocaban una disminución de la secreción de estradiol y progesterona.<sup>12</sup> En nuestro trabajo lo observado fue que las pacientes con un BMI <19 y que por ende tenían niveles más elevados de Ghrelina, presentaron valores estadísticamente inferiores tanto de estradiol como de progesterona. A pesar de esta diferencia, la cantidad de ovocitos maduros captados en ambos grupos no alcanzó la significancia estadística.

Trabajando con embriones de ratones, cerdo y embriones partenotas, la literatura refleja cómo esta hormona, cuando se encuentra en niveles suprafisiológicos, inhibe el desarrollo embrionario, disminuyendo el número de células tanto del macizo celular interno como del citotrofoblasto.<sup>15</sup> En nuestras pacientes a pesar de observar una mejor calidad embrionaria en aquellas con un adecuado

estado nutricional (81% vs 74% de embriones de buena calidad), esta diferencia no fue significativa.

En cuanto a los mecanismos de implantación y embarazo, sin dudas la Ghrelina tiene un papel relevante. Ya se describió el patrón de expresión que tienen sus receptores a nivel endometrial, el cual es máximo durante el período de ventana del mismo. En cultivos de células endometriales, la expresión del RNAm de la Ghrelina se incrementa cuando las células estromales comienzan a transformarse en desiduales.<sup>13</sup> En nuestro grupo de pacientes con niveles más elevados de Ghrelina, es decir, con BMI < 19, la tasa de implantación fue menor (12% vs 33%). Esta diferencia no fue significativa debido claramente a la N de pacientes del trabajo. No ocurrió lo mismo con la tasa de embarazo, donde las diferencias fueron ampliamente significativas entre los dos grupos (Grupo A 65% vs 26% Grupo B).

### Conclusión

Probablemente la causa de los pobres resultados reproductivos en pacientes con bajo peso que realizan TRA no es una sola. Sin lugar a dudas existen muchos factores conocidos como son los bajos niveles de Leptina, las alteraciones en la secreción de la CRH, la alteración en el eje tiroideo, y muchos otros factores que probablemente se develarán en el futuro. Creemos que la Ghrelina, debido al importante rol que cumple en la homeostasis energética del organismo y su relación con la función reproductiva, sería uno de los tantos mediadores que intentarían impedir el desarrollo de un embarazo en aquellos estados donde el organismo no se encontraría en condiciones para llevarlo a cabo, tal como Frisch lo mencionó hace ya 30 años.

Además, el hecho de presentar una correlación lineal entre los niveles de Ghrelina en plasma y líquido folicular, dosajes sanguíneos de esta hormona, nos permitiría saber también qué es lo que está sucediendo a nivel gonadal.

### Referencias

1. Bouchard C, Tremblay A, Leblanc C, Lortie G, Savard R, Theriault G. A method to assess energy expenditure in children and adults. *Am J Clin Nutr* 1983;37:461-467.
2. Bolumer F, Olsen J, Rebagliato M, Saez-Lloret I, Bisanti L. Body mass index and delayed conception: a European multicentre study on infertility and subfecundity. *Am J Epidemiol* 2000;151:1072-9.
3. Zaadstra BM, Seidell JC, Van Noord PA, Velde ER, Habbema JD, Vrieswijk B, et al. Fat and female fecundity: prospective study of effect of body fat distribution on conception rates. *BMJ* 1993;306:484-487.
4. Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Short F, Anyaoku V, Reed MJ, et al. Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1992;36:105-111.
5. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-660.
6. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4753-4758.
7. Leidy HJ, Williams NI. Meal energy content is related to features of meal-related ghrelin profiles across a typical day of eating in non-obese premenopausal women. *Horm Metab Res* 2006;38:317-322.
8. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50:1714-1719.
9. Budak E, Fernández Sanchez M, Bellver J, Cerveró A, Simón C, and Pellicer A. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertility and Sterility* 2006;85:1563-1581.
10. Schneider LF, Warren MP. Functional hypothalamic amenorrhea is associated with elevated ghrelin and disordered eating. *Fertil Steril* 2006;86:1744-1749.
11. Vulliamoz NR, Xiao E, Xia-Zhang L, Germond M, Rivier J, Ferin M. Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5718-5723.
12. Viani I, Vottero A, Tassi F, Cremonini G, Sartori C, Bernasconi B, Ferrari B, Ghizzoni L. Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*. First published ahead of print January 29, 2008 10.1210/jc.2007-2063.
13. Landgren Stavreus-Evers B, Aghajanova L, Rumman A. Ghrelin and ghrelin receptor in luteal phase human endometrium. *ASRM Congress* 2007.
14. Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, et al. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod* 2002;67:1768-1776.
15. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 2003;144:1594-1602.