

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
 7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
 8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
 - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaria de SAMeR: info@samer.org.ar

Obesidad y disminución del éxito reproductivo femenino: Posible asociación con los niveles séricos de ghrelina

Julio Manuel Novillo Estofán,¹ Mariana Hernández,¹ Verónica Cantarelli,² Marina Flavia Ponzio,² Daniel Estofán,¹ Gustavo Estofán,¹ Patricia Estofán,¹ Rosa Molina,³ Ana Carolina Martini²

¹ Centro Integral de Ginecología, Obstetricia y Reproducción (CIGOR)

² Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

³ Laboratorio de Andrología y Reproducción (LAR).

Provincia de Córdoba, Argentina.

Reproducción 2016;31:109-131

Resumen

La obesidad femenina se asocia a subfertilidad y, en ocasiones, a una disminución en la ghrelina (Ghr) sérica. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, utilizando a los ratones como modelo experimental, detectamos que tanto la hiperghrelinemia como la disminución en la Ghr endógena en las primeras fases de la gestación retrasaba el desarrollo preimplantatorio de los embriones así como su implantación. Por otro lado, dos estudios clínicos realizados con mujeres de bajo peso o normopeso informaron una relación negativa entre las concentra-

ciones de Ghr (séricas y/o del fluido folicular) y la viabilidad o clivaje embrionario. Resta por conocer si la hipoghrelinemia asociada a la obesidad constituye una de las posibles causas de sus alteraciones reproductivas. Es por ello que en el presente estudio nos propusimos investigar, en mujeres bajo tratamiento de fertilización asistida de alta complejidad (ICSI) que asistieron a un centro privado de reproducción asistida, la posible variación en los niveles séricos de Ghr de acuerdo al índice de masa corporal (IMC) y su asociación con las concentraciones de hormonas reproductivas y el éxito del tratamiento. Para esto, se estudiaron desde julio de 2014 a marzo de 2015, 75 mujeres con indicación de ICSI, < 40 años, sin síndrome de ovario poliquístico, cuyas parejas no presentaran factor masculino severo. Las mismas fueron clasificadas según los criterios de IMC de la OMS como: normopeso ($N = 18,5 \leq IMC < 25$),

Correspondencia: Julio Manuel Novillo Estofán
Correo electrónico: jmanuelnovillo@gmail.com

sobrepeso ($S = 25 \leq IMC < 30$) y obeso ($O = IMC \geq 30$). Treinta pacientes pertenecían al grupo N, 29 al S y 16 al O. La edad de las pacientes y los años de esterilidad promedio fueron $34,5 \pm 0,4$ y $3,6 \pm 0,3$ respectivamente, sin diferencias significativas entre los grupos. Contrariamente a lo esperado, la Ghr sérica fue significativamente mayor en el grupo O vs S ($2559,7 \pm 297,9$ vs $1695,3 \pm 182,4$ pg/ml, $p < 0,05$). No se detectaron asociaciones significativas entre los niveles de esta hormona y los parámetros reproductivos evaluados en este estudio. Detectamos sin embargo que, a medida que aumentó el IMC, se observó una disminución significativa (análisis de regresión lineal) en los niveles basales de FSH (Coef: $-0,11$, $p < 0,05$), LH (Coef: $-0,12$, $p < 0,05$) y estradiol (Coef: $-1,78$, $p < 0,05$). También aumentaron los días de estimulación hormonal necesarios y las dosis de gonadotrofinas requeridas para lograr una respuesta ovárica adecuada (Coef: $0,09$, $p < 0,05$). Detectamos además un incremento en los niveles séricos de insulina (Coef: $0,68$, $p < 0,05$) en el día de la punción. No se encontraron diferencias entre grupos en el número de ovocitos obtenidos, el grado de maduración de los mismos, la tasa de fertilización, la calidad y desarrollo embrionarios, ni en los porcentajes de embarazo o abortos. En conclusión, el aumento en el IMC se asoció a alteraciones endocrinológicas basales, pero ni la obesidad ni la concentración sérica de Ghr afectaron el éxito del tratamiento de fertilización asistida.

Palabras claves. Ghrelina, obesidad, ICSI, ART, fertilidad.

Obesity and assisted reproduction outcome: Possible association with serum ghrelin

Summary

Female obesity has been associated with subfertility and, in some cases, with changes in serum ghrelin (Ghr). Recent studies performed in animal models, revealed that hiperghrelinemia as well as hipoghrelinemia during early gestation, alter embryo pre-implantation development and implantation itself. Furthermore, two clinical studies carried out with underweight or normalweight women, reported a negative correlation between Ghr concentrations (serum and follicular fluid) and embryo viability

or cleavage. It still remains unknown if low concentrations of Ghr, which is an obesity trait, is one of the causes of subfertility. In this study, we aimed to investigate in women with indication of ICSI (intracytoplasmic sperm injection), the possible association between Ghr, body mass index (BMI), other reproductive hormones and reproductive treatment success. We evaluated 75 women (from July 2014 to March 2015) that assisted to the "Centro Integral de Ginecología Obstetricia y Reproducción" (CIGOR) at Cordoba, Argentine. Women recruited were younger than 40, without polichistic ovarian syndrome and their partners did not show severe male factor infertility. Thirty patients were normal ($N = 18.5 \leq BMI < 25$), 29 were overweight ($OW = 25 \leq BMI < 30$) and 16 were obese ($OB = BMI \geq 30$) in accordance with World Health Organization (WHO) criteria. Patients' age or years of sterility did not vary between groups, and were 34.5 ± 0.4 and 3.6 ± 0.3 respectively. Serum Ghr was significantly higher in OB than OW (2559.7 ± 297.9 vs 1695.3 ± 182.4 pg/ml, $p < 0.05$). No associations were detected between Ghr and the reproductive parameters evaluated (number of oocytes retrieved, oocyte maturation, fertilization rate, embryo quality and development, and pregnancy or abortion rate). Applying linear regression analysis, we found a negative association between BMI and basal concentrations of FSH (Coef: -0.11 , $p < 0.05$), LH (Coef: -0.12 , $p < 0.05$) or estradiol (Coef: -1.78 , $p < 0.05$) and a positive association between BMI and insulin levels (Coef: 0.68 , $p < 0.05$) or days of hormonal stimulation necessary to obtain a satisfactory ovarian response (Coef: 0.09 , $p < 0.05$). No differences between groups were detected in the number of oocytes retrieved or its maturation, fertilization rate, embryo quality and development or pregnancy and abortion rate. In conclusion, BMI increase was associated with abnormalities on basal hormones concentrations; but neither obesity nor serum Ghr affected the assisted reproduction treatment outcome.

Key words. Ghrelin, obesity, ICSI, ART, fertility.

Introducción

Obesidad:

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que una persona es "obesa" cuando registra un índice de masa corporal (IMC)

mayor a 30 kg/m². Esta medida se calcula como el peso del individuo (en kg) sobre su altura (en metros) al cuadrado. De acuerdo a la misma, los estados nutricionales se clasifican en bajo peso (IMC < 18,5), normopeso (18,5 ≤ IMC < 25), sobrepeso (25 ≤ IMC < 30) y obeso (IMC ≥ 30).¹

Diversos estudios a nivel mundial señalan que la obesidad es una patología que se está convirtiendo en pandemia.²⁻⁴ Afecta no sólo a los países industrializados, sino también a aquellos en vías de desarrollo; en México se registran, por ejemplo, índices de obesidad mayores al 32% y de sobrepeso mayores al 70%.⁴ En Europa, la mitad de las mujeres en edad reproductiva presentan sobrepeso u obesidad.⁵⁻⁷ A su vez la OMS ha estimado que en el año 2015, a nivel mundial, habrá más de 2 mil millones de adultos con sobrepeso y 700 millones con obesidad.³

En nuestro país, según relevamientos del año 2013, la situación no es muy diferente. El 57,9% de la población presenta exceso de peso y la obesidad aumentó, de 2009 a 2013, de 18,0% a 20,8%.^{8,9} Esto otorga gran relevancia al estudio de esta patología en nuestro medio y a sus comorbilidades. Algunas de los posibles disturbios de salud asociados son las enfermedades cardíacas, síndrome metabólico, diabetes tipo II, cáncer, patologías hepáticas, etc.¹⁰⁻¹² La esfera reproductiva no está exenta de estas alteraciones y numerosos trabajos informan acerca de un impacto negativo de la obesidad sobre la fertilidad.¹³⁻²⁰

De hecho, la esterilidad es otra de las patologías que se encuentra en aumento durante los últimos años. Según informes de la Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva, en el año 2013 se realizaron más de 12.000 ciclos de fertilización asistida. El estudio de la esterilidad debe ser afrontado teniendo en cuenta a los dos miembros de la pareja y se considera “pareja estéril” a aquella que no puede concebir en forma natural manteniendo relaciones sexuales sin la utilización de métodos anticonceptivos por un año o más.²¹ Las principales causas de esterilidad masculina pueden ser agrupadas en factores anatómicos (obstrucción de los conductos seminales, eyaculación retrógrada, varicocele, etc), factores propios de los espermatozoides (teratozoospermia, oligozoospermia, azoospermia), factores hormonales, factores inmunológicos y factores genéticos, entre otros.^{22,23} En el caso de la mujer, las principales causas de infer-

tilidad se pueden agrupar en edad avanzada (mayor a 40 años), factores anatómicos (por ejemplo, obstrucción de trompas de Falopio), anomalías uterinas (por ejemplo, tabique, miomas, pólipos), endometriosis, alteraciones hormonales (variaciones en las concentraciones de hormonas sexuales), enfermedades de transmisión sexual, etc.²⁴

El aumento simultáneo en la incidencia de ambas patologías, obesidad y esterilidad, ha llevado a los científicos a evaluar la posible relación causa-efecto entre estas enfermedades. Actualmente se conoce que, en el caso de los varones, la obesidad se asocia a disminución de la calidad espermática, hipogonadismo, disminución de la libido y disfunción eréctil.^{14,17,25,26}

En relación a las mujeres, aquellas que son obesas tienen aumentado en tres veces el riesgo de sufrir infertilidad, en comparación a aquellas con IMC normal.²⁷ Esto se explica por el hecho de que tanto la iniciación (pubertad) como el mantenimiento de las funciones reproductivas se relacionan estrechamente con un peso corporal “óptimo”.¹³ Razones evolutivas apoyan este enunciado, ya que se requiere un nivel adecuado de reservas para afrontar con éxito un embarazo/preñez y, especialmente, el gasto energético vinculado a la lactancia. Es por esto que las mujeres/hembras serían más susceptibles a sufrir alteraciones reproductivas asociadas a estados de desbalance energético que los varones/machos.²⁸

En ginecología, la obesidad se asocia con diversas alteraciones reproductivas, las cuales pueden categorizarse en tres: A) hormonales, B) ovárico/ovulatorias y C) endometriales.²⁹

A) Alteraciones hormonales: la obesidad afecta directa e indirectamente la secreción y biodisponibilidad de hormonas sexuales, dado que el tejido adiposo: a) es importante en el metabolismo esteroideo, para la conversión de andrógenos a estrógenos vía de la actividad aromatasas; b) el mismo regula la retención/liberación de estas hormonas debido a sus características liposolubles; c) reduce la disponibilidad de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y, por lo tanto, de las gonadotropinas FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante),^{12,30-33} d) provoca cambios en la secreción y acción de la insulina; y e) modifica las concentraciones de globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) y, por lo tanto, la disponibilidad de éstas.^{29,34}

La síntesis de SHBG está regulada por varios factores, tanto estimulantes como inhibitorios. Entre estos últimos, se encuentran los andrógenos y la insulina.³⁵ Las modificaciones en las concentraciones de SHBG son secundarias a una disminución en su síntesis hepática, resultante de la hiperinsulinemia que en general caracteriza a los cuadros de obesidad.^{34, 36} La hiperinsulinemia mencionada, a su vez, es consecuencia de una mayor secreción de adipocinas proinflamatorias adipocitarias y de resistina, que provocan resistencia a la insulina mediante la alteración de sus mecanismos de señalización.³⁷ Dado que la SHBG posee mayor afinidad por los andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) que por los estrógenos,³⁴ la reducción de la concentración de SHBG afecta mayormente los complejos SHBG-andrógenos.^{38, 39} Este efecto es compensado, especialmente en las mujeres que presentan obesidad central, por una elevación en las tasas de síntesis de estos esteroides sexuales.^{34, 35, 40} Por otro lado, la insulina actúa en las células granulosa, las teca y el estroma ovárico estimulando la síntesis de andrógenos.^{29, 41}

Este perfil endocrino conduce a las tres principales características fisiopatológicas por las que la obesidad afecta a la reproducción: el hiperinsulinismo; el hiperandrogenismo funcional, el cual tiene implicancias patofisiológicas en la función ovárica; y contribuye a la tercera característica, la oligo/anovulación.^{12, 29, 42, 43}

B) Alteraciones ovárico/ovulatorias: si bien no existe consenso, algunos grupos han descrito una asociación entre el sobrepeso/obesidad y la calidad y/o madurez ovocitaria. Existen varios estudios clínicos desarrollados en mujeres con sobrepeso/obesidad sometidas a tratamientos de fertilización asistida que reportan una asociación negativa entre el exceso de peso y el número de ovocitos recuperados y/o la maduración de los mismos.⁴⁴⁻⁴⁶ Sin embargo, Bellver y col (2010), en un análisis retrospectivo de 6.500 ciclos de fertilización *in vitro* (FIV), no encontraron reducción significativa en el número y/o la madurez de los ovocitos recuperados de pacientes obesas en comparación a otras de peso normal.⁵⁰

Otro marcador de la calidad ovocitaria en el área de la fertilización asistida es el porcentaje o tasa de fertilización. Algunos estudios informaron acerca de una disminución en este parámetro en mujeres obesas comparadas con aquellas de peso normal,⁴⁷⁻⁴⁹ otros grupos no encontraron relación alguna entre estas variables.^{13, 45, 46, 50}

C) Alteraciones endometriales: con respecto al posible efecto de la obesidad y el desarrollo/función endometrial, los trabajos realizados no han arrojado resultados definitivos.^{29, 51, 52} Fue propuesto que el modelo de ovodonación discriminaría, en las pacientes obesas, los efectos que pudieran vincularse a la calidad ovocitaria/embrionaria de aquellos endometriales.⁵³ Un grupo analizó 450 ciclos de donación de óvulos con posterior transferencia embrionaria y observaron que las receptoras con obesidad (IMC > 30) presentaban una reducción significativa en las tasas de embarazo, siendo 30 kg/m² el punto de corte que presenta un factor negativo para el éxito del tratamiento.⁵⁴ A pesar de que la validez del modelo de ovodonación fue cuestionada,⁵⁵ estos estudios demostrarían que el endometrio está comprometido en las mujeres obesas. Trabajos recientes han estudiado la receptividad endometrial (durante la ventana de implantación) mediante el análisis de la expresión génica endometrial en mujeres obesas frente a controles normopeso, informando que las pacientes con obesidad mostraban una expresión génica endometrial alterada.⁵⁶

Finalmente, cabe aclarar que la obesidad ha sido asociada a complicaciones obstétricas^{57, 58} e incluso a efectos deletéreos a largo plazo sobre la morbilidad de la descendencia.^{59, 60}

En resumen, el origen de los efectos deletéreos provocados por la obesidad sobre la reproducción femenina parece ser el tejido adiposo, con su secreción diferencial de factores y hormonas metabólicas tales como las ya mencionadas, insulina y resistina y, por lo tanto, la alteración en los perfiles de hormonas reproductivas. Sin embargo, existen otras sustancias con efectos metabólicos y reproductivos fundamentales, tales como leptina y Ghr.^{13, 30}

La Leptina es una hormona derivada de los adipocitos que merece un párrafo especial. Las concentraciones plasmáticas de la misma se correlacionan con la cantidad de tejido adiposo del organismo (se encuentran significativamente aumentados en la obesidad) y ejerce efectos anorexigénicos a nivel central.⁶¹⁻⁶³ En el sistema reproductivo, receptores para leptina fueron detectados en la superficie de las células foliculares, las teca y las intersticiales del ovario. Algunos estudios *in vivo* han demostrado que la leptina posee un efecto inhibitorio en el funcionamiento de

esta gónada, impidiendo la producción de esteroides sexuales, probablemente antagonizando el efecto de factores estimulantes como la insulina, la LH y el factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1).^{34, 64, 65} Existen estudios que postulan que la leptina es necesaria para la activación y el funcionamiento adecuado del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, la función gametogénica y la implantación.^{29, 66} Se ha observado que algunos casos de obesidad se asocian a cuadros de resistencia a la leptina.⁶³

Ghrelin:

La Ghrelina (Ghr) es una proteína de 28 aminoácidos que se secreta principalmente en estómago e hipotálamo de mamíferos.⁶⁷ Posee un alto nivel de conservación estructural a lo largo de la evolución, lo que es característico de los compuestos de gran importancia biológica. Sus principales acciones son la estimulación de la hormona de crecimiento (GH) y de la ingesta de alimentos (efecto orexigénico).^{67, 68} Pero Ghr se secreta también en otros tejidos y órganos tales como intestino, páncreas, hígado, e incluso en el sistema reproductor masculino y femenino.⁶⁸

A este respecto, se ha descrito la expresión de Ghr y de sus receptores (GHS-R1a y GHS-R1b) en numerosos sitios del aparato reproductivo, incluyendo trompas de Falopio, ovario, útero, próstata y testículos. Se conoce además que la Ghr posee efectos complejos, básicamente inhibitorios, sobre la fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.⁶⁹⁻⁷⁶ De esta forma se ha propuesto que la Ghr funciona como una señal inhibitoria de la función reproductiva evitando el gasto energético asociado (búsqueda de la pareja, apareamiento, gestación, lactancia, etc) ante las situaciones de escasez nutricional.⁷⁷⁻⁷⁹ De hecho, se ha informado tanto en modelos animales como en humanos, que la escasez de nutrientes y/o el bajo peso se correlacionan con concentraciones plasmáticas elevadas de Ghr.^{80, 81} Por el contrario, existen estudios que informan una disminución de las concentraciones de esta hormona en personas obesas.⁸²

Si bien, como hemos mencionado, la hiperghrelinemia ejerce efectos inhibitorios en la fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal y la fertilidad, durante la preñez/embarazo se observa un aumento fisiológico en los niveles plasmáticos de la Ghr de la madre y el feto, lo que sugiere que este péptido posee un papel importante en la nor-

mal progresión de la gestación.^{79, 83} En concordancia, se ha informado de la presencia del GHS-R1a en placenta, endometrio y trompas de Falopio,^{17, 75, 83} por lo que se ha sugerido que la Ghr podría constituir uno de los numerosos péptidos que participan en el proceso de implantación embrionaria.⁸⁴⁻⁸⁶ Apoyando esta hipótesis, se ha comprobado *in vitro* que este péptido es capaz de estimular la decidualización de las células del estroma endometrial,^{83, 87} necesaria para la implantación.

Con respecto al desarrollo embrionario, los estudios son contradictorios. Realizados en modelos animales *in vitro*, algunos apoyan la hipótesis de que el péptido retarda el desarrollo embrionario,⁸⁸ mientras que otros informan resultados opuestos.^{79, 86} Finalmente, en un estudio *in vitro* en el que se evaluaron diferentes dosis de Ghr sobre la maduración y el desarrollo embrionario de ovocitos ovinos, determinaron que mientras las dosis medias del péptido (50 ng/ml) aumentaban el número de blastocitos y su cantidad de células en comparación a dosis menores (0 o 10 ng/ml), la adición de concentraciones mayores de Ghr (250 ng/ml) disminuían estos parámetros; esto sugiere que existe una dosis "ideal" de Ghr que estimula el desarrollo embrionario.⁸⁹

En resumen, más allá de las discrepancias entre los autores, es aparente que la Ghr es capaz de afectar el desarrollo embrionario y/o fetal así como la implantación. Es por ello que desde hace algún tiempo en nuestro laboratorio, comenzamos a investigar el papel de la Ghr y de la hipo/hiperghrelinemia en la función reproductiva de ratones hembras. Determinamos que tanto la aplicación de dosis altas de Ghr (4 nmol/animal/día, hiperghrelinemia) como la de un antagonista [(D-Lys3) GHRP-6, 6 nmol/animal/día, inhibición de la Ghr endógena] disminuían la tasa de fertilización, atrataban el desarrollo embrionario preimplantatorio y aumentaban la pérdida embrionaria y/o la atrofia fetal. Todas estas evidencias apoyan fuertemente la hipótesis de que los desbalances en los niveles de Ghr alteran los procesos gestacionales tempranos.⁹⁰

Ghrelin y obesidad:

En base a lo enunciado en párrafos anteriores y a las evidencias que sugieren que el bajo peso y/o la obesidad cursan con niveles alterados de Ghr, sería importante evaluar la posible asociación del péptido con la fertilidad de la mujer.

Existen, a nuestro entender, tres trabajos clínicos relevantes a este respecto. El primero de ellos es un estudio publicado en 2011 y realizado en mujeres bajo tratamiento de fertilización asistida. En dicho estudio se informó la presencia de Ghr en el fluido folicular y que la misma se correlacionaba con sus niveles plasmáticos, siendo un 13% menor; esto sugiere que la Ghr folicular es producto de trasudado plasmático. Estos autores indicaron, además, que la concentración del péptido en plasma y/o en fluido se correlacionaba negativamente con el clivaje embrionario, la viabilidad de los mismos y la secreción de progesterona y estrógenos.⁹¹ Cabe destacar que las mujeres reclutadas para este estudio tenían un IMC correspondiente al normopeso.

En otro trabajo relacionado, autores españoles estudiaron en mujeres con normopeso la posibilidad de que los valores plasmáticos de Ghr durante el embarazo temprano pudieran ser utilizados como un marcador implantatorio, tal como las concentraciones de la subunidad beta de gonadotropina coriónica, de progesterona, de citoquinas, etc. No encontraron, sin embargo, que esta proteína tuviera un valor pronóstico en los resultados de los procedimientos de FIV, ni que existieran diferencias en sus concentraciones plasmáticas en mujeres que no lograron la concepción en comparación a aquellas que sí lo hicieron.⁹²

Finalmente, en un trabajo en el que se estudió a la Ghr como un marcador predictivo de los resultados de FIV, se demostró que una situación nutricional patológica tal como el bajo peso (IMC < 19), en la cual la Ghr plasmática está aumentada, se asoció a una disminución en los niveles de hormonas esteroideas al día de la punción, en la tasa de implantación y en la probabilidad de embarazo clínico con respecto a mujeres de peso normal.⁸⁰

En resumen, existen algunas evidencias clínicas que apoyan la hipótesis de que los valores aumentados de Ghr plasmática y/o folicular impactan negativamente sobre la calidad embrionaria, la implantación y/o la secreción de hormonas esteroideas. No se conoce, sin embargo, a nivel clínico, si las concentraciones disminuidas de este polipéptido también provocan estas alteraciones en los eventos gestacionales tempranos. Dado que a nivel experimental hemos determinado que dos extremos de la concentración de Ghr gestacional,

hiper e hipoghrelinemia, afectan la fertilización, el desarrollo temprano y la implantación,⁹⁰ sería interesante estudiar también qué es lo que ocurre en mujeres que presentan niveles disminuidos de esta proteína, tal como ocurriría en aquellas que padecen obesidad.

Por lo tanto, en base a los experimentos realizados en nuestro laboratorio y a la bibliografía específica podemos hipotetizar que *“los niveles disminuidos de Ghr séricos, propios de la obesidad, se asocian a alteraciones en el éxito reproductivo de mujeres sometidas a tratamientos de fertilización asistida de alta complejidad”*.

Objetivos:

1. Determinar, en mujeres incluidas dentro de un tratamiento de fertilización asistida de alta complejidad, la posible variación en los niveles séricos de Ghr de acuerdo al índice de masa corporal (normopeso, sobrepeso y obesidad).

2. Correlacionar, en dichas pacientes, las concentraciones séricas de Ghr con las de otras hormonas relacionadas, tales como progesterona, estrógenos e insulina.

3. Evaluar asimismo, la posible asociación entre los niveles de Ghr y variables indicadoras del éxito reproductivo tales como respuesta a la estimulación ovárica, calidad y maduración ovocitaria, calidad y desarrollo embrionario temprano, embarazo químico y clínico, etc.

Materiales y métodos

En el presente estudio prospectivo se analizaron 75 pacientes femeninas, miembros de parejas que fueron sometidas a un tratamiento de fertilización asistida en un centro privado de fertilización asistida. Cuando la pareja estéril inicia el tratamiento de reproducción asistida, su médico de cabecera y el equipo que realiza los controles del tratamiento completan una planilla de seguimiento de estimulación. En ésta se incluyeron datos filiatorios, información clínica específica, resultados del espermograma del hombre, la indicación de la aplicación de una técnica de reproducción asistida, el protocolo de estimulación hormonal recomendado de acuerdo a las características de la paciente y los días y drogas implementadas finalmente para lograr la estimulación ovárica.

Utilizando dichas planillas y, conforme al proyecto propuesto, se seleccionaron las pacientes que finalmente fueron incluidas en el estudio. Para ello, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

- Indicación de tratamiento de fertilización asistida de alta complejidad (ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoide).
- IMC mayor a 18,5.
- Estimulación ovárica llevada a cabo con gonadotrofinas y antagonista de GnRH.

Fueron excluidas del estudio aquellas pacientes que:

- Tenían una edad mayor o igual a 40 años.
- Cuya pareja presentaba factor masculino severo (es decir, globozoospermia, astenozoospermia y/o criptozoospermia severa, muestra criopreservada y/u obtenida a partir de biopsia testicular, como también muestras heterólogas).
- Tratamientos realizados con ovodonación.
- Mujeres con síndrome de ovario poliquístico diagnosticado.

Las parejas que cumplieron con los requisitos mencionados anteriormente fueron invitadas a participar en el estudio, informadas en forma detallada de los procedimientos propios del desarrollo del proyecto y finalmente, incluidas en el estudio mediante la aceptación del consentimiento informado respectivo (evaluado y aprobado por el CIEIS del Hospital Nacional de Clínicas).

Para poner a prueba la hipótesis de que los niveles de Ghr séricos varían en función del IMC, lo cual podría estar relacionado con el éxito reproductivo de las mujeres sometidas a tratamiento de fertilización asistida, las pacientes reclutadas fueron divididas en tres grupos de acuerdo a este parámetro antropométrico, quedando los mismos definidos de la siguiente manera: normopeso ($18,5 \leq \text{IMC} < 25$), sobrepeso ($25 \leq \text{IMC} < 30$) y obeso ($\text{IMC} \geq 30$).¹

A continuación, se presentan en forma cronológica los exámenes químicos y clínicos que se realizaron y los procedimientos médicos y de laboratorio propios del tratamiento de fertilización asistida de alta complejidad. Las variables reproductivas que fueron registradas y/o analizadas estadísticamente en este estudio se han remarcado en *itálica* a fin de facilitar su identificación.

1. Procedimiento de fertilización asistida:

1a. Evaluación inicial de la pareja estéril:

Como parte de los estudios iniciales, el médico de cabecera investiga la posible etiología de la esterilidad, registra los *años de esterilidad de la pareja* (en años) y solicita *dosajes basales (día 3 del ciclo sexual) de hormonas reproductivas* (FSH, LH y estradiol). Estas últimas fueron evaluadas en el laboratorio de análisis clínicos del centro privado de fertilización asistida mediante la técnica de electroquimioluminiscencia, utilizando los *kits* FSH, LH y EII (*Roche*) y cuantificando en el equipo COBAS e411 (*Roche*).

1.2 Estimulación ovárica con gonadotrofinas:

La estimulación ovárica controlada se realiza con el objetivo de obtener una respuesta supra-fisiológica, obteniendo así un mayor número de ovocitos que en un ciclo de ovulación espontáneo. Esto incrementa las posibilidades de obtener un mayor número de embriones viables (se transfieren 1 o 2), favoreciendo así las probabilidades de embarazo.

Para dar comienzo a la estimulación de la ovulación se confirmó la ausencia de actividad folicular mediante una ecografía transvaginal y el dosaje de estradiol sérico basal. Las pacientes comenzaron luego la estimulación con gonadotrofinas, compuestas por una combinación de FSH recombinante (*Gonal, Merck Serono*) y de gonadotrofina humana de menopausia (*HMG, Menopur, Merck Serono*), en diferentes dosis. Estos esquemas fueron indicados por los médicos de cabecera, de acuerdo al diagnóstico, la edad, la reserva ovárica, los antecedentes y las respuestas a estimulaciones previas de las pacientes. Las dosis de gonadotrofinas iniciales sugeridas para pacientes con reserva ovárica normal son 225-300 UI/día. Por otro lado, para evitar la "luteinización folicular prematura", las pacientes recibieron distintas dosis de antagonistas de GnRH (*Lupron, ABOIT; Cetrotide, Merck Serono*) según protocolos indicados por el médico.⁹³

En general, los días necesarios para lograr una estimulación ovárica exitosa varían entre 6 y 9. Se registraron por lo tanto las drogas empleadas en cada paciente, las *dosis totales utilizadas* y los *días transcurridos entre el comienzo de la estimulación y la punción ovárica*.

Cabe aclarar que a los fines de controlar la estimulación ovárica, las pacientes fueron sometidas a un monitoreo ecográfico transvaginal y dosaje de estradiol sérico regular durante toda la duración de la estimulación, con el objetivo de determinar el número y tamaño (mm) de folículos presentes en cada ovario. Los parámetros registrados durante la misma fueron: *número de folículos al día 3* (potenciales de desarrollarse), el *número de folículos desarrollados* hasta el último control y el diámetro de los mismos.

Se indujo la maduración folicular mediante la aplicación de 10.000 UI de hCG (hormona gonadotrofica humana, *Gonacor, FERRING; Ovidrel, Merck Serono*) cuando al menos dos folículos alcanzaron un tamaño de 17 mm o más (folículos maduros) y un nivel de estradiol sérico equivalente a 100-150 pg/dl por cada folículo mayor a 14 mm que se haya visualizado en la ecografía.

1.3 Obtención y dosaje de hormonas en el día de la punción ovárica (36 hs después de la aplicación de hCG):

Las pacientes asistieron a la institución el día de la aspiración folicular con un ayuno de 12 hs. Se procedió a pesarlas y medirlas, a fin de calcular el *índice de masa corporal*: peso (kg)/altura (m)². Posteriormente se procedió a realizar la canalización de rutina para la inyección de la anestesia y, sólo a aquellas mujeres que participaban de nuestro estudio, se les extrajo una muestra de sangre venosa (de 5 ml). La misma, permaneció por 30 min a baño maría para asegurar el exudado y, a continuación, se la centrifugó por 5 min a 300 g para separar el suero. Éste fue almacenado en tubos de plástico rotulados y conservados a -20°C hasta el momento de la cuantificación hormonal.

Una vez realizados todos los procedimientos de aspiración de las pacientes incluidas en este estudio, se procedió a cuantificar la concentración de Ghr, estradiol, progesterona e insulina de la muestra de sangre obtenida el día de la punción. La primera hormona fue cuantificada mediante un *kit* de RIA comercial de la marca *DIAsource* y las demás mediante la técnica de electroquimioluminiscencia con *kits* específicos y equipamiento *Roche*.

1.4 Procedimiento de aspiración folicular:

Los folículos fueron aspirados luego de 36 hs de la aplicación del hCG. La aspiración se realizó me-

dante punción folicular transvaginal bajo control ecográfico, de acuerdo a protocolos estándar. Los líquidos foliculares aspirados fueron recuperados en tubos conteniendo medios de cultivo adecuados (M-HTF suplementado con 15% SSS, *Irvine Scientific*) y, a medida que se obtenían en quirófano, eran enviados al laboratorio de embriología.

En el laboratorio, se realizó la búsqueda y recuperación de las gametas femeninas bajo lupa estereoscópica. Cada ovocito encontrado fue lavado y separado de las células del *cumulus* mediante la enzima hialuronidasa (*Irvine Scientific*). Cada gameta fue colocada luego en otra capsula conteniendo medio GIVF (*Vitrolife*) bajo aceite y se registraron *la cantidad de ovocitos recuperados* de cada paciente, el *grado de inmadurez* (profase o metafase I) o *madurez* (metafase II) de los mismos y la presencia de *ovocitos activados* espontáneamente (“posmaduros”, signo de baja calidad), de acuerdo con procedimientos estándar. Las gametas femeninas fueron mantenidas en estufa de cultivo (37° C, saturación de humedad y 6,2% de CO₂) hasta el momento del ICSI.

1.5 Recolección y procesamiento de la muestra de semen:

Las muestras de semen fueron obtenidas mediante masturbación el mismo día de la punción, en frasco estéril, tras una abstinencia sexual de 3 a 5 días. Las mismas fueron evaluadas y procesadas dentro de la primera hora desde la obtención de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud.⁹⁴ Brevemente, se determinó el volumen seminal (en pipeta graduada), la viscosidad, la concentración y la movilidad espermática. Estos últimos dos parámetros fueron cuantificados en cámara de Makler. Una vez realizada esta evaluación inicial, se procedió a la separación de los espermatozoides móviles de acuerdo a las características de cada muestra, ya sea por la técnica de *Swim-up* o por la de gradientes discontinuos de Isolete.

1.6 Inyección intracitoplásmica de un espermatozoide (ICSI)

El procedimiento de ICSI se realiza luego de 5-7 horas desde la aspiración, mientras se deja estabilizar y madurar a los ovocitos en estufa de cultivo (CO₂ 6,2%). La técnica de inyección del espermatozoide se realiza sobre platina térmica

mediante un micromanipulador. Los espermatozoides fueron elegidos según su movilidad y morfología e inyectados en el interior del ovocito, atravesando para esto la zona pelúcida y la membrana plasmática. La resistencia a la inyección presentada por la membrana plasmática se utiliza como indicador de calidad y madurez ovocitaria, por lo que se tuvo en cuenta el % de ovocitos con signos de inmadurez. Finalmente, los ovocitos inyectados fueron ubicados en gotas individuales y nuevamente en estufa de cultivo (en medio G1, *Vitrolife* bajo aceite).

1.7 Evaluación de la fertilización

Luego de 17-19 hs desde el ICSI, se analizó la fertilización y sobrevivencia de los ovocitos inyectados bajo microscopio invertido. Se registraron las características de fertilización de cada ovocito, pudiendo encontrarse los mismos en los siguientes estados: fertilizado normalmente, fertilizado con un número anormal de pronúcleos, no fertilizado o degenerado. Su evolución fue controlada diariamente hasta el momento de la transferencia. A partir de estos resultados y, en base al número de ovocitos inyectados, se calcularon las siguientes variables: % de ovocitos fertilizados normalmente, % de ovocitos fertilizados que degeneraron y % de ovocitos con nucleación anormal.

1.8 Desarrollo y transferencia embrionaria

El desarrollo embrionario fue evaluado el día 2 luego del procedimiento de ICSI. Se tuvo en cuenta el número de núcleos visibles por blastómera de los embriones, siendo de buen pronóstico los embriones con 0/1 núcleo visible por blastómera y, de mal pronóstico los embriones con más de 1 núcleo visible por blastómera.

La transferencia embrionaria se realizó a las 48 o 72 hs desde la inyección de los ovocitos. En base a su morfología, se clasificó a los embriones en clase IV, III⁺, III, II y I dependiendo de la simetría en el tamaño y forma de las blastómeras, del porcentaje de fragmentos y la presencia de varios núcleos. Cabe destacar que los embriones de clase IV son los de mejor calidad y los de clase I de mal pronóstico.

Asimismo, de acuerdo a las recomendaciones médicas y de laboratorio, se transfirieron uno o dos embriones por ciclo. El procedimiento incluye aspiración de los embriones dentro de un caté-

ter y transferencia a la cavidad uterina mediante vía vaginal bajo control ecográfico.

Las variables derivadas de estas evaluaciones/procedimientos fueron: número de embriones viables para la transferencia, *número de embriones transferidos*, % de embriones de calidad clase II-III y % de embriones de calidad clase III⁺-IV.

1.9 Controles y procedimientos posteriores a la transferencia embrionaria

Desde el día de la aspiración folicular, se indica a las pacientes la administración de progesterona (*Crinone*, *Merck Serono*) con el fin de aumentar las posibilidades de implantación.

Las pacientes fueron citadas 14 días después de la aspiración folicular para realizar un dosaje de -gonadotropina coriónica humana (β -hCG) en sangre; en el caso de que el valor del mismo fuera superior a 5 UI/ml, se consideró "positivo". A las 48 hs, se repitió este análisis. En los casos en que ambos dosajes fueran valores positivos (en forma creciente), se consideró como "embarazo químico". Luego de 20 días de la β -hCG positiva (34 días desde la aspiración), se realizó una ecografía transvaginal, considerándose como "embarazo clínico" a la presencia de al menos un saco gestacional con embrión visible en su interior. A partir de estos resultados se calcularon las siguientes variables: % de embarazos químicos (embarazo químico/transferido) y % de embarazos clínicos; esta última resulta en la diferencia entre los embarazos químicos y los abortos.

La concentración plasmática de β -hCG se cuantificó mediante electroquimioluminiscencia con kits específicos (*Roche*).

2. Tratamiento estadístico de los resultados:

Los resultados expresados como porcentaje (% de embarazo químico, % de embarazo clínico y % de abortos) fueron procesados con chi-cuadrado, controlando el cumplimiento de los supuestos necesarios para la aplicación de esta prueba.

Las variables expresadas como media \pm error estándar (EE) fueron evaluadas mediante ANOVA a una vía (niveles del factor: normopeso, sobrepeso, obeso). Previamente se controló el cumplimiento de los supuestos necesarios para la aplicación del ANOVA y, en los casos necesarios, se procedió a transformar las variables para lograr distribución normal (% de ovocitos en profase;

transformado por logaritmo en base 10). En último término, se aplicó un *test* no paramétrico (Kruskall-Wallis; para las variables: concentración de Insulina, IMC, % de ovocitos activados, % de ovocitos fertilizados con nucleación anormal). Cabe aclarar que para la realización de esta estadística no se consideró a la variable edad de la mujer como una covariable, ya que no se detectaron diferencias significativas en este parámetro entre los grupos.

Se realizaron análisis de regresión lineal tomando como variables regresoras a la edad de la mujer y al IMC o a la edad de la mujer y la concentración sérica de Ghr.

En todos los casos, se consideraron diferencias significativas a aquellas en las cuales el valor de *p* era menor a 0,05. Los datos fueron procesados con el programa estadístico *InfoStat* (Versión 2013).

Resultados

Los resultados del presente trabajo se presentan a continuación de acuerdo al orden en que se realizaron las evaluaciones químicas/clínicas de las pacientes y los procedimientos médicos.

En el presente estudio se evaluaron a 75 mujeres que fueron sometidas a un tratamiento de fertilización asistida de alta complejidad en centro privado de reproducción asistida en el período julio de 2014 a marzo de 2015. En la Tabla 1 se presentan las características generales de las mismas, incluyendo IMC, edad y años de esterilidad previos a su consulta en el centro. Tal como puede apreciarse, no existe diferencia en los promedios de edad o años de esterilidad de estas pacientes. En base al criterio de clasificación de las mismas utilizado en este estudio, sí se detectaron diferencias significativas en los valores de IMC.

Tabla 1. Características generales de las pacientes incluidas en el presente estudio.

Parámetro	Normopeso	Sobrepeso	Obeso
Nº pacientes/grupo	30	29	16
IMC (kg/m ²)	21,6 ± 0,3 ^a	26,6 ± 0,2 ^b	33,8 ± 1,0 ^c
Edad (años)	34,7 ± 0,5	34,8 ± 0,6	33,3 ± 1,1
Esterilidad (años)	3,8 ± 0,4	4,3 ± 0,6	4,1 ± 0,7

Las pacientes incluidas en este estudio concurren a un centro de reproducción asistida desde

julio de 2014 a marzo de 2015 y fueron clasificadas de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC, kg/m²) en tres grupos: normopeso (18,5 < IMC < 24,9); sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC). Los datos se expresan como media±error estándar. Esterilidad: se refiere al tiempo (en años) transcurrido desde que la pareja mantiene relaciones sexuales sin la utilización de métodos anticonceptivos hasta la consulta. Letras diferentes indican diferencias significativas (*p* < 0,05).

En cuanto al perfil hormonal de las pacientes incluidas en nuestro estudio, en la Tabla 2 se presentan los valores basales de FSH, LH y estradiol de cada uno de los grupos de IMC considerados.

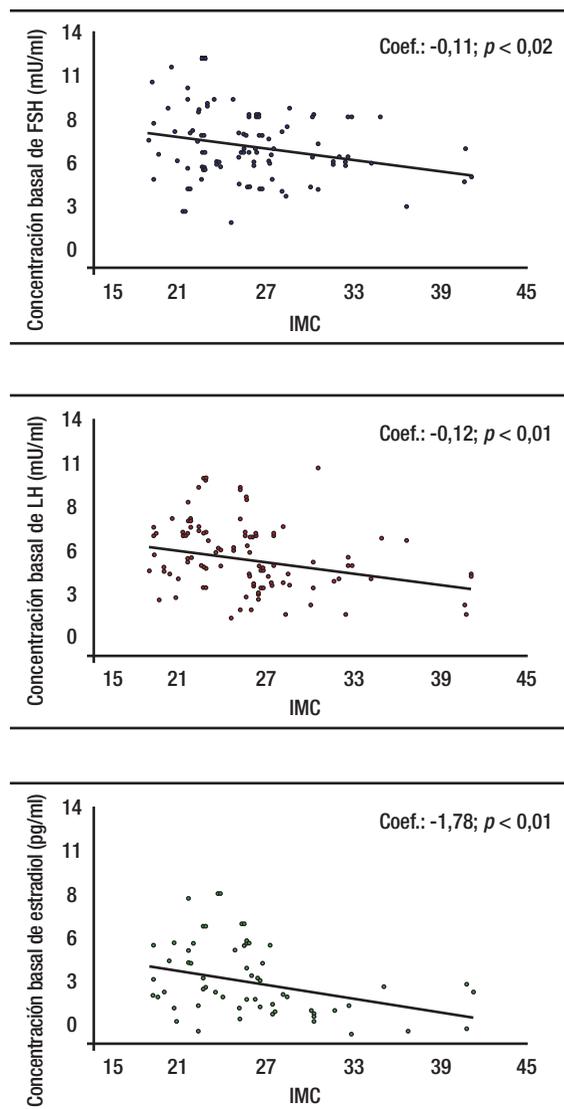
Tabla 2. Concentración basal de FSH, LH y estradiol de las pacientes incluidas en este estudio.

Parámetro	Normopeso (n=30)	Sobrepeso (n=29)	Obeso (n=16)
Concentración de FSH sérica (mUI/ml)	7,7 ± 0,5	6,9 ± 0,3	6,3 ± 0,4
Concentración de LH sérica (mUI/ml)	6,0 ± 0,4	5,1 ± 0,4	4,7 ± 0,6
Concentración de 17β-estradiol sérico (pg/ml)	58,2 ± 6,4	49,6 ± 5,7	26,9 ± 4,0*

Las pacientes concurren a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015 y fueron clasificadas de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC, kg/m²) en tres grupos: normopeso (18,5 < IMC < 24,9); sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC). La concentración hormonal se refiere a valores basales (día 3 del ciclo sexual). Los datos se expresan como media±error estándar. [FSH: hormona folículo-estimulante; LH: hormona luteinizante. *: *p* < 0,05 vs demás grupos].

Tal como puede apreciarse en la Tabla mencionada, las pacientes obesas presentan valores basales de estrógenos significativamente menores que los demás grupos. En cuanto a las concentraciones séricas de gonadotropinas, si bien no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se evidencia una tendencia de disminución a medida que aumenta el IMC. Este perfil, adquiere significancia estadística cuando se analizan los coeficientes de regresión lineal entre el IMC (variable regresora) y los niveles de estas hormonas reproductivas (Figura 1).

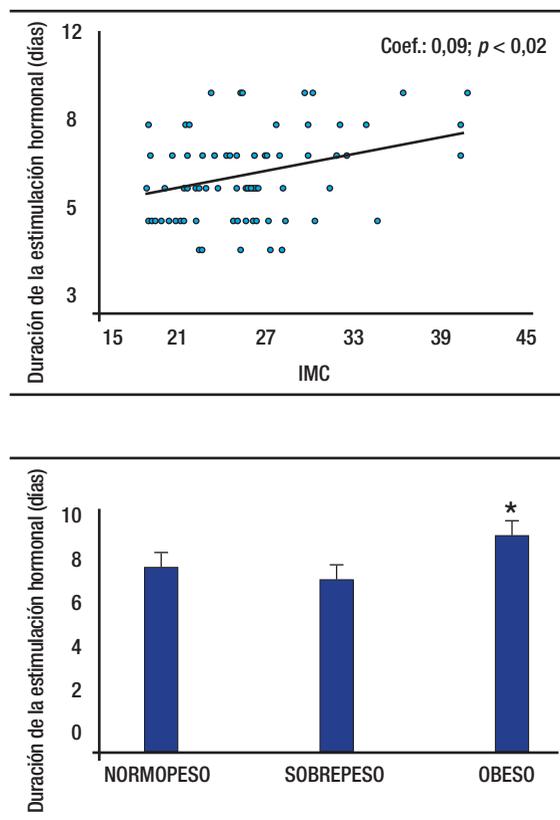
Figura 1. Análisis de regresión lineal de los niveles hormonales basales (día 3 del ciclo sexual) de FSH (hormona foliculo-estimulante), LH (hormona luteinizante) y estradiol (17β-estradiol) en relación al índice de masa corporal (IMC, kg/m²). Las pacientes incluidas en este estudio asistieron a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015.



En cuanto a los días de estimulación hormonal requeridos para lograr una estimulación ovárica adecuada, pudimos comprobar que a medida que se incrementa el IMC, también aumentan los días de estimulación necesarios. Es así como las mujeres obesas requirieron significativamente más días de estimulación que las con normopeso o sobrepeso (Figura 2). Asimismo, también se requirieron, en el grupo de pacientes obesas, mayores dosis totales

de gonadotrofinas que en las normales o con sobrepeso (dosis total de FSH recombinante + HMG: obeso= 2179,7 ± 166,2 vs normopeso= 1729,2 ± 118,5 y sobrepeso= 1955,6 ± 82,6; $p < 0,05$).

Figura 2. Análisis de regresión lineal entre los días de estimulación hormonal necesarios para lograr un crecimiento folicular adecuado y el índice de masa corporal (IMC, kg/m²) (panel A). En el panel B se grafican los días de estimulación promedio por grupo de IMC [normopeso (18,5 < IMC < 24,9); sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC)] y los datos se expresan como media ± error estándar. Las pacientes incluidas en este estudio concurren a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015. *: $p < 0,05$ vs demás grupos.



Asimismo, y tal como era de esperar, observamos una asociación significativa entre los niveles séricos de estradiol el día de la administración de hCG y la respuesta ovárica a la estimulación (número de ovocitos recuperados) (Coef = 0,004, $p < 0,01$).

En cuanto a la respuesta y calidad ovocitaria de estas pacientes, observamos que no presentaron diferencias significativas en lo que a respuesta ovulatoria o madurez ovocitaria respecta (Tabla 3).

Tabla 3. Respuesta de las pacientes a la estimulación con gonadotropinas y características de los ovocitos obtenidos mediante el tratamiento de fertilización asistida.

Parámetro	Normopeso (n=30)	Sobrepeso (n=29)	Obeso (n=16)
Número de folículos al día 3	12,8 ± 5,9	10,3 ± 5,1	14,8 ± 9,6
Folículos desarrollados (%)	95 ± 6	100 ± 10	93 ± 13
Número de ovocitos recuperados durante la punción	10,1 ± 6,2	8,6 ± 4,0	9,9 ± 4,3
Ovocitos en profase (%)	18 ± 3	8 ± 3	12 ± 3
Ovocitos en metafase I (%)	4 ± 2	4 ± 2	7 ± 3
Ovocitos en metafase II (%)	76 ± 4	84 ± 4	76 ± 5
Ovocitos activados (%)	2 ± 1	0 ± 0	1 ± 1

Las pacientes incluidas en este estudio concurren a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015 y fueron clasificadas de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC, kg/m²) en tres grupos: normopeso (18,5 < IMC < 24,9); sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC). Los datos se expresan como media±error estándar. Número de folículos al día 3: cantidad de folículos basales, observados por ecografía al tercer día del ciclo, previo a la estimulación hormonal. Folículos desarrollados: % de los folículos evaluados al día 3 que se desarrollaron en respuesta a la estimulación hormonal. Los % de ovocitos en profase, metafase y activados, se calculan en relación a la cantidad de ovocitos recuperados durante la punción.

El día de la punción ovárica se extrajo una muestra de sangre a las pacientes incluidas en el estudio, en la que se evaluaron las concentraciones séricas de Ghr, insulina, estradiol y progesterona. En la Tabla 4 se presentan los niveles de estas últimas dos hormonas. Como puede apreciarse, no existen diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 4. Concentraciones séricas de estradiol y progesterona el día de la punción ovárica de las pacientes incluidas en este estudio.

Parámetro	Normopeso (n=30)	Sobrepeso (n=29)	Obeso (n=16)
Concentración sérica de 17β-estradiol (pg/ml)	1105,4 ± 107,1	1018,7 ± 73,9	1317,8 ± 204,9
Concentración sérica de progesterona (ng/ml)	5,3 ± 0,5	5,1 ± 0,6	4,6 ± 0,5

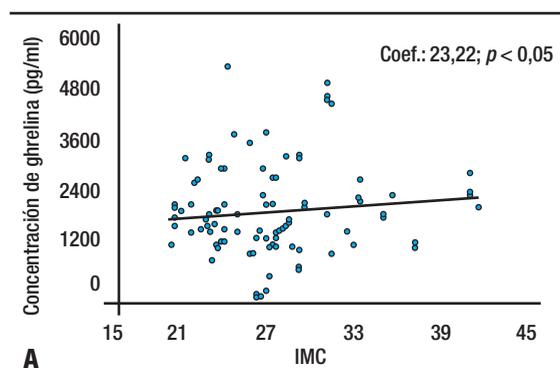
Las pacientes concurren a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015 y fueron clasificadas de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC, kg/m²) en tres grupos: normopeso (18,5 < IMC < 24,9); sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC). Los datos se expresan como media±error estándar.

Los resultados acerca de la posible asociación existente entre el IMC y las concentraciones séricas de Ghr se presentan en la Figura 3. Como puede observarse, no existe relación lineal entre ambas variables; sin embargo, el grupo de mujeres obesas presentó concentraciones de Ghr en suero el día de la punción ovárica significativamente mayores que el grupo con sobrepeso.

Excepto en el caso de LH, no detectamos asociaciones entre los valores séricos de Ghr y los de hormonas reproductivas basales (FSH: coef = 0,0001 $p = 0,5$; LH: coef = -0,0005 $p = 0,02$; Estradiol: coef = -0,0008 $p = 0,8$) o en el día de la punción (Estradiol: coef = -0,03 $p = 0,6$; Progesterona: coef = 0,00002 $p = 0,9$; Insulina: coef = -0,0005 $p = 0,5$).

Asimismo, tampoco se observó asociación alguna entre las concentraciones séricas de Ghr y las variables reproductivas estudiadas en el presente proyecto (Tabla 5).

Figura 3. Análisis de regresión lineal de los niveles hormonales de ghrelina (el día de la punción ovárica) en relación al índice de masa corporal (IMC, kg/m²) (panel A). En el panel B, se grafican las concentraciones medias de ghrelina sérica de acuerdo al IMC de la paciente [normopeso (18,5 < IMC < 24,9); sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC)] y los datos se expresan como media ± error estándar. Las pacientes incluidas en este estudio concurren a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015. *: $p < 0,05$ vs sobrepeso.



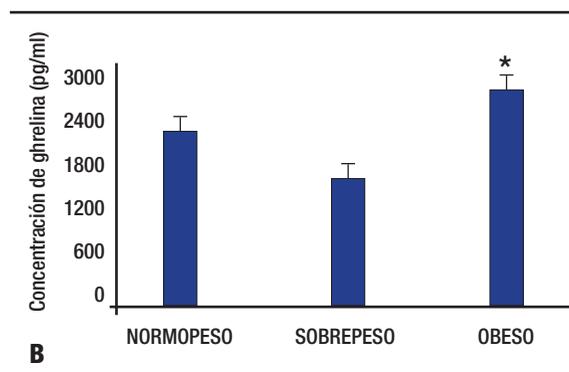


Tabla 5. Análisis de regresión lineal entre las variables reproductivas cuantificadas en este estudio y ghrelina.

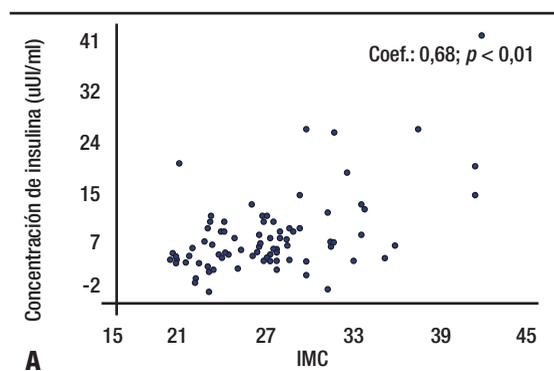
Variable	Coefficiente	p
Número de folículos al día 3 del ciclo	-0,00054	0,47
% de folículos desarrollados	0,000017	0,73
Número de ovocitos recuperados el día de la punción	0,00076	0,15
% de ovocitos en profase	0,0000042	0,81
% de ovocitos en metafase I	0,0000037	0,74
% de ovocitos en metafase II	0,0000017	0,94
% de ovocitos activados	-0,0000026	0,65
% de ovocitos inyectados con signos de inmadurez	0,000032	0,20
% de ovocitos fertilizados normales	-0,000024	0,29
% de ovocitos fertilizados que degeneraron	0,0000011	0,94
% de ovocitos fertilizados con nucleación anormal	0,000013	0,33
Desarrollo embrionario a día 2: 0/1 núcleos visible por blastómera	0,000036	0,88
Desarrollo embrionario a día 2: más de 1 núcleo visible por blastómera	-0,00015	0,30
Número de embriones viables para la transferencia	0,00012	0,51
Número de embriones de calidad clase III* o IV	0,00013	0,54
Número de embriones de calidad clase II o III	-0,00013	0,39
Número de embriones con 8 o más células	0,00001	0,96
Número de embriones con menos de 8 células	0,00011	0,56

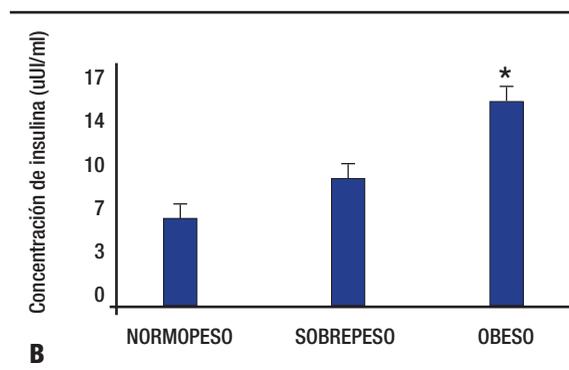
Las pacientes incluidas en este estudio concurren a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015 y fueron clasificadas de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC, kg/m²) en tres grupos: normopeso (18,5 < IMC < 24,9), sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC). Número de folículos al día 3: cantidad de

folículos basales, observados por ecografía al tercer día del ciclo, previo a la estimulación hormonal. Folículos desarrollados: % de los folículos evaluados al día 3 que se desarrollaron en respuesta a la estimulación hormonal. Los % de ovocitos en profase, metafase y activados, se calculan en relación a la cantidad de ovocitos recuperados durante la punción. Los porcentajes de fertilización (normal o anormal) y de inyección con signos de inmadurez (expresados como %) fueron calculados en relación al número de ovocitos inyectados. 0/1 núcleo visible por blastómera: en cada una de las blastómeras se visualizan 1 o ningún núcleo. Más de 1 núcleo visible por blastómera: en una o más de las blastómeras se visualizan más de 1 núcleo; signo de mal pronóstico. Número de embriones viables para la transferencia: cantidad de embriones con desarrollo/morfología aceptable al momento de la transferencia. La calidad embrionaria se cataloga, de menor a mayor, en las siguientes clases: I, II, III, III+ y IV.

Con respecto a las concentraciones de insulina sérica el día de la punción ovárica, observamos que a medida que aumenta el IMC, se incrementan también los niveles de esta hormona. Las pacientes obesas presentaron una concentración sérica de insulina significativamente mayor que las de los demás grupos (Figura 4).

Figura 4. Análisis de regresión lineal entre los niveles séricos de insulina el día de la punción ovárica y el índice de masa corporal (IMC, kg/m²) (panel A). En el panel B se grafican las concentraciones promedio de esta hormona por grupo de IMC [normopeso (18,5 < IMC < 24,9), sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC)] y los datos se expresan como media ± error estándar. Las pacientes incluidas en este estudio concurren a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015. *: p < 0,05 vs demás grupos.





En las Tablas 6, 7 y 8 se presentan los porcentajes de fertilización, desarrollo embrionario y calidad de los embriones en relación al IMC. Tal como puede comprobarse, ninguno de los grupos evaluados presentó diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros.

Tabla 6. Porcentajes de fertilización y desarrollo de los ovocitos obtenidos mediante el tratamiento de fertilización asistida.

Parámetro	Normopeso (n=30)	Sobrepeso (n=29)	Obeso (n=16)
Número de ovocitos inyectados	6,9 ± 2,7	6,9 ± 3,1	7,6 ± 2,9
Ovocitos inyectados con signos de inmadurez (%)	14 ± 4	14 ± 4	15 ± 5
Ovocitos fertilizados normales (%)	77 ± 4	76 ± 4	71 ± 4
Ovocitos fertilizados que degeneraron (%)	6 ± 2	7 ± 3	4 ± 2
Ovocitos fertilizados con nucleación anormal (%)	7 ± 2	5 ± 1	11 ± 5

Las pacientes incluidas en este estudio concuerrieron a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015 y fueron clasificadas de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC, kg/m²) en tres grupos: normopeso (18,5 < IMC < 24,9), sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC). Número de ovocitos inyectados: cantidad de ovocitos maduros (en metafase II) que fueron sometidos a ICSI (inyección intracitoplasmática de un espermatozoide). Estos datos se expresan como media±error estándar. Los porcentajes de fertilización (normal o anormal) y de inyección con signos de inmadurez (expresados como %) fueron calculados en relación al número de ovocitos inyectados.

Tabla 7. Desarrollo de los embriones obtenidos mediante el tratamiento de fertilización asistida al 2º día desde la inyección intracitoplásmica del espermatozoide.

Parámetro	Normopeso (n=30)	Sobrepeso (n=29)	Obeso (n=16)
0/1 núcleo visible por blastómera	4,1 ± 0,4	3,8 ± 0,5	4,8 ± 0,6
Más de 1 núcleo visible por blastómera	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,3	0,6 ± 0,2

Las pacientes incluidas en este estudio concuerrieron a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015 y fueron clasificadas de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC, kg/m²) en tres grupos: normopeso (18,5 < IMC < 24,9), sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC). Los datos se expresan como media±error estándar. 0/1 núcleo visible por blastómera: en cada una de las blastómeras se visualizan 1 o ningún núcleo. Más de 1 núcleo visible por blastómera: en una o más de las blastómeras se visualizan más de 1 núcleo; signo de mal pronóstico.

Tabla 8. Desarrollo y calidad de los embriones obtenidos mediante el tratamiento de fertilización asistida al 3º día desde la inyección intracitoplásmica del espermatozoide.

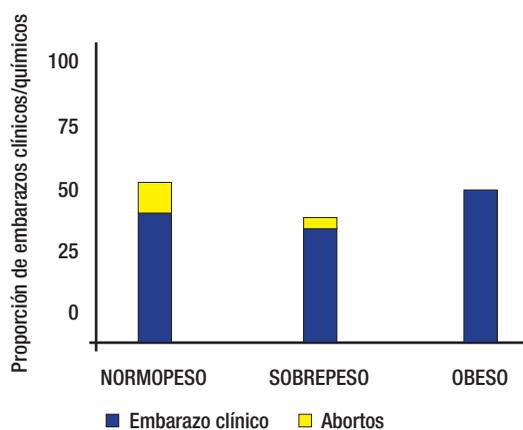
Parámetro	Normopeso (n=30)	Sobrepeso (n=29)	Obeso (n=16)
Número de embriones viables para la transferencia	3,8 ± 1,6	3,5 ± 1,6	4,5 ± 1,8
Número de embriones transferidos	1,1 ± 0,9	1,1 ± 0,9	1,5 ± 0,5
Embriones con calidad embrionaria clase III+ o IV	2,9 ± 0,4	2,6 ± 0,4	3,6 ± 0,5
Embriones con calidad embrionaria clase II o III	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,3
Embriones con 8 o más células en día 3	2,6 ± 0,4	2,9 ± 0,5	3,3 ± 0,5
Embriones con menos de 8 células en día 3	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,4	1,7 ± 0,4

Las pacientes incluidas en este estudio concuerrieron a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015 y fueron clasificadas de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC, kg/m²) en tres grupos: normopeso (18,5 < IMC < 24,9), sobrepeso (25 < IMC < 29,9) u obeso (30 < IMC). Los datos se expresan como media±error estándar. Número de embriones via-

bles para la transferencia: cantidad de embriones con desarrollo/morfología aceptable al momento de la transferencia. La calidad embrionaria se cataloga, de menor a mayor, en las siguientes clases: I, II, III, III⁺ y IV.

Finalmente, en la Figura 5 se presentan los porcentajes de embarazo químico y de embarazo clínico. Tampoco se registraron en estas variables diferencias significativas entre los grupos.

Figura 5. Proporción de embarazos clínicos (presencia de saco vitelino, con latido, evaluado por ecografía ~30 días desde la transferencia embrionaria) sobre los químicos (dosaje positivo de la gonadotropina coriónica humana al día 14 desde la transferencia). La diferencia entre ambos se debe a la ocurrencia de abortos. Las pacientes incluidas en este estudio concurren a un centro de reproducción asistida desde julio de 2014 a marzo de 2015 y fueron clasificadas de acuerdo a su índice de masa corporal (IMC, kg/m²) en tres grupos: normopeso ($18,5 < \text{IMC} < 24,9$), sobrepeso ($25 < \text{IMC} < 29,9$) u obeso ($30 < \text{IMC}$).



Discusión

En el presente estudio evaluamos en pacientes mujeres sometidas a un tratamiento de fertilización asistida de alta complejidad, los niveles séricos de Ghr y su posible asociación con el IMC y el éxito del procedimiento. Detectamos que las mujeres obesas presentaban concentraciones de Ghr mayores que las de los demás grupos (significativamente sólo con el grupo sobrepeso) y que estos valores no se relacionaban con el éxito del procedimiento de fertilización asistida. El IMC sin embargo, se asoció negativamente a las concentraciones basales de gonadotropinas y estradiol; y

positivamente a los niveles séricos de insulina, las dosis de gonadotropinas y los días de tratamiento hormonal necesarios para lograr una estimulación ovárica adecuada.

En base a nuestros resultados es aparente que las alteraciones reproductivas vinculadas a la obesidad informadas por algunos autores no se relacionen con los niveles séricos de Ghr sino, más específicamente, con el IMC.

Como primer punto a analizar, cabe destacar que la población incluida en el presente estudio fue homogénea desde el punto de vista etario y de los años de esterilidad previos a la consulta al centro privado de reproducción asistida. Esto constituye una fortaleza a la hora de evaluar el éxito reproductivo en relación al IMC y/o a los niveles séricos de Ghr.

En nuestro estudio observamos además una disminución en los niveles basales de hormonas reproductivas (FSH, LH y estradiol) a medida que aumentaba el IMC. Esto coincide con numerosos estudios en los que encontraron una asociación negativa entre estas hormonas y dicho parámetro antropométrico. Esta alteración hormonal vinculada al aumento del peso corporal se postula como una de las causas de la oligo/anovulación que se detecta, con frecuencia, en mujeres obesas.^{57, 95} Actualmente, se propone a la hormona anti-mülleriana como un marcador preciso de la reserva ovárica,^{57, 96, 97} se ha postulado que esta hormona estaría disminuida en pacientes obesas.⁹⁸ Otro factor que contribuye a estas alteraciones ovulatorias es el escenario inflamatorio crónico provocado por las citoquinas secretadas por el tejido adiposo, que se encuentra aumentado en estas pacientes.^{99, 100} Ello desencadena, a su vez, la hiperinsulinemia que normalmente se asocia al exceso de peso.^{34, 36, 37} Nuestros resultados confirman una mayor concentración de insulina sérica en el grupo obeso con respecto a los demás. Este dosaje se realizó el día de la punción ovárica por practicidad metodológica; sin embargo, y en base a la bibliografía ya descrita, es probable que las pacientes cursaran con estos niveles aumentados a lo largo de todo el ciclo de estimulación.

En contraposición a lo hipotetizado en este estudio, los valores séricos de Ghr fueron significativamente mayores en las pacientes obesas que en aquellas con sobrepeso. No se registraron diferencias en este parámetro entre el grupo obeso y

normopeso. Esto contrasta con lo informado por diversos autores que sostienen que en las personas obesas los niveles de Ghr plasmáticos se encuentran disminuidos.^{101, 102} Sin embargo, las bases fisiopatológicas de esta supuesta disminución no están claras. Existen trabajos que indican que la insulina estimula la secreción de Ghr (probablemente vía hipoglucemia)¹⁰³⁻¹⁰⁵ y otros que informan lo contrario.¹⁰⁶ En línea con este primer postulado, la hiperinsulinemia presente en nuestras pacientes obesas podría constituir la base de su hiperghrelinemia. La relación hiperghrelinemia/hiperinsulinemia podría sin embargo ser opuesta; en un modelo experimental de rata se informa que es Ghr quien estimula la secreción de insulina.¹⁰⁷ Por otro lado, se ha propuesto que el aumento de la leptina plasmática, asociada a la obesidad, estimula la síntesis/secreción de Ghr.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Resta para el futuro evaluar, en muestras almacenadas de estas pacientes, las concentraciones séricas de leptina.

Por otro lado, es posible que la falta de acuerdo entre nuestro estudio y aquellos que proponen a la hipoghrelinemia como una particularidad de la obesidad, se deba a uno o varios de los siguientes factores: a) un tamaño muestral reducido, particularmente en el grupo obeso; b) un nivel de obesidad relativamente bajo; c) la ausencia de datos acerca de la etiología de la obesidad de nuestras pacientes; y/o d) al hecho de que nuestras muestras séricas para el dosaje de Ghr fueron obtenidas tras una estimulación suprafisiológica con gonadotrofinas. No existen publicaciones, al menos a nuestro entender, que registren el efecto de altas concentraciones de FSH y LH sobre la secreción del péptido en pacientes obesas. Dos de los tres trabajos clínicos mencionados en el capítulo de introducción que correlacionaban los niveles de Ghr con los resultados del procedimiento de fertilización asistida evaluaban la concentración de este péptido en el día de la punción; sin embargo, las pacientes de estos estudios tenían peso normal o incluso, disminuido.^{80, 91, 92} Por otro lado, se conoce que las mujeres en fase folicular tardía poseen mayores concentraciones de Ghr que los hombres.^{105, 108, 109} Dado que esta fase coincide con los mayores valores de estrógenos, es posible que éstos aumenten la secreción del péptido; este comportamiento podría estar influenciado por el IMC. Es importante destacar, además, que los va-

lores normales femeninos de Ghr que informa el *kit* con que se realizaron las cuantificaciones, son de 1141,9 pg/ml (mín: 454,4 pg/ml y máx: 2565,7 pg/ml), sin aclarar el estado nutricional de las donantes. Es decir, que en todos nuestros grupos, las concentraciones medias de Ghr fueron mayores a las informadas por el inserto. Esto apoya nuestra hipótesis de que la estimulación con gonadotrofinas podría modificar la secreción de Ghr. Lamentablemente y, dado los costos de los reactivos para dosar Ghr, no fue factible cuantificar este parámetro antes y después de la estimulación.

Con respecto al nivel de obesidad de nuestras pacientes y a su etiología, es importante destacar que dos tercios de nuestras pacientes obesas presentaban un IMC ≤ 32 kg/m²; es decir, relativamente bajo. La disminución en la concentración sérica de Ghr vinculada a la obesidad podría estar asociada a IMC mayores, del tipo de la obesidad mórbida.¹¹⁰ Asimismo, existen diferentes etiologías de obesidad^{111, 112} y no se conoce, en cada una de ellas, cómo varían los niveles plasmáticos de esta hormona. Es así como, por ejemplo, el síndrome de Prader Willi (patología congénita que se asocia con obesidad e hiperfagia) se caracteriza por un aumento en los niveles plasmáticos de Ghr.¹¹³⁻¹¹⁵

Finalmente, cabe destacar que si bien el IMC es una medida antropométrica que se utiliza con mucha frecuencia debido a su simplicidad, no es la más adecuada para reflejar el estado nutricional de una persona. Existen otros parámetros, tales como el diámetro de cintura, el índice cintura/cadera y la evaluación de pliegues que, junto con el IMC, constituyen medidas más específicas.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Dado que la Ghr (así como la leptina y otras hormonas relacionadas) se asocia estrechamente al balance energético, es posible que cuantificar solo el IMC no sea la mejor estrategia.

En cuanto al éxito de la estimulación ovárica con gonadotrofinas, las pacientes obesas presentaron menor respuesta que el resto de los grupos. A pesar de que el número de ovocitos recuperados el día de la punción no varió significativamente, requirieron mayor cantidad de días de tratamiento hormonal y mayores dosis totales de gonadotrofinas para lograr una estimulación ovárica adecuada. Bellver y col llama a este efecto “resistencia gonadotrófica”.⁵⁰ Esto se refiere a que las pacien-

tes con IMC elevado requieren mayores dosis de fármacos, más cantidad de días de estimulación y aún así, en algunos casos, se obtiene una respuesta ovárica disminuida. Este fenómeno de resistencia a las gonadotrofinas se explicaría por una absorción reducida del fármaco y/o una distribución anormal del mismo; esto reduce las concentraciones efectivas de FSH sobre el ovario, y se suma a las alteraciones en el metabolismo esteroideo y a las bajas concentraciones de SHBG comentadas en el capítulo de introducción.^{12, 46, 50, 95, 119, 120} Otras hipótesis no excluyentes consideran que la hiperinsulinemia afecta en forma directa la fisiología ovárica.^{12, 42, 43}

Si bien el estado endocrino y metabólico de nuestras pacientes obesas se encontró alterado, no detectamos diferencias estadísticamente significativas en los parámetros ovocitarios analizados (número y porcentaje de folículos desarrollados, número de ovocitos recuperados durante la punción y porcentajes de ovocitos inmaduros, maduros y activados). En los últimos años, los estudios se han enfocado al efecto de la obesidad sobre el complejo cúmulo-ovocito y su ambiente próximo, es decir, el fluido folicular y las células de la granulosa. Se cree que este ambiente al cual el complejo mencionado es expuesto durante su desarrollo, ya sea *in vivo* o *in vitro*, puede tener efectos importantes en la fecundación y el posterior desarrollo embrionario; esto se ha llamado “competencia ovocitaria”. El metabolismo de la glucosa y sus distintos componentes son esenciales para la producción energética en el complejo cúmulo-ovocito, como así también para la maduración nuclear y citoplasmática a través de los sustratos de otras vías metabólicas asociadas a la glucosa como la de las pentosas fosfato.^{12, 121} Algunos estudios han demostrado que, en mujeres obesas, existiría una concentración incrementada de glucosa, lactato e incluso insulina en el fluido folicular, postulando que este incremento de las concentraciones normales podría ser la causa de la baja calidad ovocitaria encontrada en estas pacientes.¹²² En concordancia con esto, algunas publicaciones informan que los estados de sobrepeso y obesidad ejercen un efecto perjudicial en la cantidad de ovocitos recuperados y/o en su maduración.^{13, 44-46} Sin embargo, otros trabajos realizados sobre muestras más numerosas informan lo contrario.^{50, 95} Los resultados de

nuestro trabajo coinciden con estos últimos. Asimismo, los valores de estrógenos y progesterona el día de la punción detectados en nuestro estudio, que no difieren entre los grupos, apoyan la falta de diferencias significativas en el número de folículos ováricos desarrollados durante la estimulación. El hecho de que el 17 β -estradiol estuviera disminuido en las pacientes obesas a nivel basal y no el día de la punción, puede deberse justamente a la estimulación exógena con gonadotrofinas.

Por otro lado, y en concordancia con la mayoría de la literatura analizada, tampoco detectamos una asociación significativa entre el IMC y la tasa de fertilización.^{13, 45, 46, 50, 123, 124} Tampoco se observaron diferencias en los porcentajes de ovocitos fertilizados que luego degeneraron o que exhibieron una nucleación anormal o en aquellos que al momento de la ICSI mostraron signos de inmadurez.

Con respecto a la calidad y el desarrollo embrionario al día 2 o 3 desde el procedimiento de ICSI, tampoco se encontraron diferencias. Dado que la clasificación de calidad embrionaria es de tipo cualitativa, resulta difícil realizar estudios multicéntricos de validez científica. De todas maneras, aquellos trabajos que utilizaron clasificaciones morfológicas de los embriones no reportaron asociaciones entre el IMC y la calidad embrionaria.^{13, 46, 50} A pesar del tamaño de muestra reducido de nuestro estudio, el hecho de que todos los resultados provengan de una sola institución dentro de un mismo período de tiempo constituye una fortaleza porque incrementa la consistencia entre las prácticas de laboratorio realizadas, los protocolos establecidos para los tratamientos de alta complejidad y la población de pacientes reclutadas.

En resumen, las variaciones en el IMC de nuestras pacientes no ejercieron efectos significativos en la cantidad de ovocitos obtenidos, su potencial fertilizante y/o la cantidad o calidad de embriones desarrollados. En cuanto al posible efecto de Ghr sobre estos parámetros reproductivos, no detectamos asociación alguna. Al respecto, en el trabajo de Li y col informan que, si bien la Ghr no se correlaciona con el IMC de sus pacientes, sí lo hizo con las variables reproductivas por ellos evaluadas.⁹¹ Cabe aclarar que la muestra de pacientes reclutadas pertenecía solo a la categoría de normopeso.⁹¹ Estos autores detectaron presen-

cia de Ghr en el fluido folicular al momento de la punción ovárica y observaron que los niveles de la misma eran un 13% menor a los plasmáticos y se correlacionaban estrechamente con estos últimos; por ello postularon que la Ghr del fluido folicular provenía de trasudado plasmático. Hallaron, además, que la Ghr sérica y/o folicular se correlacionaba negativamente con la madurez ovocitaria, la tasa de clivaje posfertilización y el número de embriones viables por paciente. Hipotetizaron, por lo tanto, que el aumento de Ghr plasmático ejercía efectos deletéreos sobre la calidad/viabilidad embrionaria. Dado que estos autores detectaron además una relación inversa entre Ghr e insulina, contrariamente a lo encontrado en nuestro estudio, dedujeron que estos efectos negativos de la Ghr eran mediados por una disminución en las concentraciones foliculares de insulina, y por lo tanto, en la oferta de glucosa necesaria para la correcta maduración ovocitaria.⁹¹ Otro estudio clínico en el que se le atribuyeron efectos negativos a Ghr sobre el éxito del procedimiento de fertilización asistida, fue el de Sabattini y col.⁸⁰ Estos autores informaron, trabajando con mujeres de bajo peso y, por lo tanto, de Ghr sérica elevada, que el aumento de este péptido se correlacionaba con una menor tasa de embarazo. No encontraron sin embargo, relación entre la Ghr y la tasa de ovulación, la madurez de estas gametas, la tasa de fertilización, la calidad embrionaria y/o la tasa de implantación.⁸⁰ Finalmente, en un trabajo de autores españoles en el que se postuló a la Ghr como un posible marcador temprano del éxito reproductivo, no encontraron relación alguna entre este péptido y las tasas de embarazo químico, clínico o la frecuencia de abortos espontáneos. Nuevamente, estos autores trabajaron con pacientes pertenecientes al grupo normopeso.⁹²

Por nuestra parte, en el presente estudio no detectamos diferencias en las tasas de embarazo químico y clínico o en la de abortos entre los grupos normopeso, sobrepeso y obeso. Esto se encuentra en línea con la falta de efectos negativos, vinculados al IMC, en las variables reproductivas evaluadas en este estudio. Sin embargo, existen algunas publicaciones que atribuyen a la obesidad un efecto negativo sobre las tasas de embarazo y de nacidos vivos.^{95, 125-127} Otros trabajos informan lo contrario.^{45, 46, 49, 124, 128-130} Al respecto y, dada la

duración reducida de esta investigación, desconocemos a la fecha si los embarazos clínicos detectados llegarán o no a término.

En resumen, el presente estudio vincula al aumento en el IMC, pero no a las modificaciones en la concentración de Ghr sérica, con alteraciones en las hormonas reproductivas basales y en los niveles de insulina. Estas alteraciones no parecen ser lo suficientemente importantes como para afectar el éxito reproductivo, cuando la paciente es sometida a un tratamiento de estimulación ovárica, ICSI y transferencia embrionaria. Si bien la bibliografía es contradictoria y, nuestros resultados no lograron encontrar asociaciones negativas entre el IMC y las variables de éxito reproductivo analizadas, el posible mecanismo patofisiológico por el cual la obesidad presenta este impacto negativo permanece todavía sin dilucidarse.

Desde el punto de vista evolutivo y, dado el importante gasto energético que implica llevar adelante un embarazo/preñez y la posterior lactancia, cabría esperar que la suficiencia y, aún el exceso de energía, fuera beneficioso a los fines reproductivos. Sin embargo y, tal como ocurre en tantas otras funciones fisiológicas, el “exceso” parece ejercer efectos perjudiciales. No obstante, al menos en lo que se refleja en nuestros resultados, la tecnología y con ella, el surgimiento de las técnicas de fertilización asistida, han logrado desafiar las leyes de la naturaleza.

Referencias

1. World Health Organization. The international classification of adult underweight, overweight and obesity according to BMI. Geneva: World Health Organization, 2004.
2. Ogbuji QC. Obesity and reproductive performance in women. African journal of reproductive health 2010; 14, 143-151.
3. World Health Organization. World health statistics 2010. (World Health Organization, 2010).
4. European Association for the study of Obesity. Obesity: perception and policy. Multi-country review and survey of policymakers, 2014.
5. European Association for the study of Obesity. International Obesity Task Force. (2002).
6. Balen AH, Anderson RA, Policy, P. C. o. t. BFS. Impact of obesity on female reproductive health: British fertility society, policy and practice guidelines. Human Fertility 2007; 10: 195-206.

7. Koning A, Kuchenbecker W, Groen H, Hoek A, Land J, Khan K, Mol B. Economic consequences of overweight and obesity in infertility: a framework for evaluating the costs and outcomes of fertility care. *Human Reproduction Update* 2010; 16: 246-254.
8. Ferrante D, Virgolini M. Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2005: resultados principales: prevalencia de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares en la Argentina. *Revista Argentina de Cardiología* 2007; 75: 20-29.
9. Ministerio de Salud. Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo para enfermedades no transmisibles. Presidencia de la Nación (2013).
10. Björntorp P. Obesity: a chronic disease with alarming prevalence and consequences. *Journal of Internal Medicine* 1998; 244: 267-269.
11. Russell L, Allen B. Patient's page. Obesity and you. *Southern Medical Journal* 2008; 101: 337.
12. Bellver J. Obesidad femenina. *Cuaderno de Medicina Reproductiva* 2012; 18: 49-64.
13. Fedorcsak P, Dale PO, Storeng R, Ertzeid G, Bjercke S, Oldereid N, Omland AK, Abyholm T, Tanbo T. Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2004; 19: 2523-2528.
14. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertility and Sterility* 2008; 90: 897-904.
15. Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertility and Sterility* 2008; 90: 2222-2225.
16. Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertility and Sterility* 2004; 82: 863-870.
17. Martini AC, Tissera A, Estofán D, Molina RI, Mangeaud A, de Cuneo MF, Ruiz RD. Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertility and Sterility* 2010; 94: 1739-1743.
18. Qin DD, Yuan W, Zhou WJ, Cui YQ, Wu JQ, Gao ES. Do reproductive hormones explain the association between body mass index and semen quality? *Asian Journal of Andrology* 2007; 9: 827-834.
19. Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PA. Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertility and Sterility* 2008; 90: 346-351.
20. Strain GW, Zumoff B, Kream J, Strain JJ, Deucher R, Rosenfeld RS, Levin J, Fukushima DK. Mild Hypogonadotropic hypogonadism in obese men. *Metabolism* 1982; 31: 871-875.
21. Pandian Z, Bhattacharya S, Templeton A. Review of unexplained infertility and obstetric outcome: a 10 year review. *Human Reproduction* 2001; 16: 2593-2597.
22. Egozcue S, Blanco J, Vendrell J, Garcia F, A. Veiga, B. Aran, P. Barri, F. Vidal, J. Egozcue. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction Update* 2000; 6: 93-105.
23. O'Brien KLF, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and Sterility* 2010; 93: 1-12.
24. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* 2008; 14: 1197-1213.
25. Martini AC, Molina RI, Tissera A, Ruiz RD, de Cuneo MF. The impact of obesity on male reproduction: its biological significance. *Expert Reviews in Endocrinology and Metabolism* (2013).
26. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb A, Bonde JP, Jensen TK, Van Wely M, Cao J, Martini A, Eskandar M. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2013; 19: 221-231.
27. Rich-Edwards JW, Goldman MB, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1994; 171: 171-177.
28. Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiology & Behavior* 2004; 81: 289-317.
29. Brewer CJ, Balen AH. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction* 2010; 140: 347-364.
30. Gesink Law DC, Macle hose RF, Longnecker MP. Obesity and time to pregnancy. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2007; 22: 414-420.
31. Pralong FP, Castillo E, Rapisinho PD, Aubert ML, Gaillard RC. Obesity and the reproductive axis. *Annales d'endocrinologie* 2002; 63: 129-134.
32. Hartz AJ, Barboriak PN, Wong A, Katayama KP, Rimm AA. The association of obesity with infertility and related menstrual abnormalities in women. *Int J Obes* 1979; 3: 57-73.
33. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005; 366: 1197-1209.
34. Pasquali R, Gambineri A. Metabolic effects of obesity on reproduction. *Reproductive Biomedicine Online* 2006; 12: 542-551.
35. Von Schoultz B, Carlström K. On the regulation of sex-hormone-binding globulin—a challenge of an old dogma and outlines of an alternative mechanism. *Journal of Steroid Biochemistry* 1989; 32: 327-334.
36. Evans DJ, Hoffmann RG, Kalkhoff RK, Kissebah AH. Relationship of Androgenic Activity to Body Fat Topography, Fat Cell Morphology, and Metabolic Aberrations in Premenopausal Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1983; 57: 304-310.
37. Acosta García E. Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2012; 46: 183-194.
38. Kirschner M, Samojlik E, Drejka M, Szmalec E, Schneider G, Ertel N. Androgen-Estrogen Metabolism in Women with Upper Body Versus Lower Body Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1990; 70: 473-479.
39. Samojlik E, Kirschner M, Silber D, Schneider G, Ertel N. Elevated production and metabolic clearance rates of androgens in morbidly obese women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1984; 59: 949-954.

40. Kurtz BR, Givens JR, Komindr S, Stevens MD, Karas JG, Bittle JB, Judge D, Kitabchi AE. Maintenance of Normal Circulating Levels of 4-Androstenedione and Dehydroepiandrosterone in Simple Obesity Despite Increased Metabolic Clearance Rates: Evidence for a Servo-Control Mechanism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1987; 64: 1261-1267.
41. Dunaif A. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis 1. *Endocrine Reviews* 1997; 18: 774-800.
42. Bellver J, Busso C, Pellicer A, Remohí J, Simón C. Obesity and assisted reproductive technology outcomes. *Reproductive biomedicine online* 2006; 12: 562-568.
43. Ferrando M, Bellver J. Impacto de la obesidad sobre la reproducción humana natural y asistida. *Revista Española de Obesidad* 2008; 6: 302-316.
44. Wittemer C, Ohl J, Bailly M, Bettahar-Lebugle K, Nisand I. Does body mass index of infertile women have an impact on IVF procedure and outcome? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2000; 17: 547-552.
45. Dokras A, Baredziak L, Blaine J, Syrop C, Van Voorhis BJ, Sparks A. Obstetric outcomes after in vitro fertilization in obese and morbidly obese women. *Obstetrics & Gynecology* 2006; 108: 61-69.
46. Esinler I, Bozdogan G, Yarali H. Impact of isolated obesity on ICSI outcome. *Reproductive Biomedicine Online* 2008; 17: 583-587.
47. Salha O, Dada T, Sharma V. Influence of body mass index and self-administration of hCG on the outcome of IVF cycles: a prospective cohort study. *Human Fertility* 2001; 4: 37-42.
48. van Swieten EC, van der Leeuw-Harmsen L, Badings EA, van der Linden PJ. Obesity and clomiphene challenge test as predictors of outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2005; 59: 220-224.
49. Matalliotakis I, Cakmak H, Sakkas D, Mahutte N, Koumantakis G, Arici A. Impact of body mass index on IVF and ICSI outcome: a retrospective study. *Reproductive Biomedicine Online* 2008; 16: 778-783.
50. Bellver J, Ayllón Y, Ferrando M, Melo M, Goyri E, Pellicer A, Remohí J, Meseguer M. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertility and Sterility* 2010; 93: 447-454.
51. Cano F, Landeras J, Molla M, Gómez E, Ballesteros A, Remohí J. The effect of extreme of body mass on embryo implantation at oocytes donation program. *Fertility and Sterility* 2001; 76: S160-S161.
52. Bellver J, Rossal LP, Bosch E, Zuniga A, Corona JT, Melendez F, Gómez E, Simon C, Remohí J, Pellicer A. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertility and Sterility* 2003; 79: 1136-1140.
53. Bellver J, Melo MA, Bosch E, Serra V, Remohí J, Pellicer A. Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertility and Sterility* 2007; 88: 446-451.
54. Dessolle L, Daraï E, Cornet D, Rouzier R, Coutant C, Mandelbaum J, Antoine JM. Determinants of pregnancy rate in the donor oocyte model: a multivariate analysis of 450 frozen-thawed embryo transfers. *Human Reproduction* 2009; 30: 3082-3089.
55. Howards PP, Cooney MA. Disentangling causal paths between obesity and in vitro fertilization outcomes: an intractable problem? *Fertility and Sterility* 2008; 89: 1604-1605.
56. Bellver J, Martínez-Conejero JA, Labarta E, Alamá P, Melo MAB, Remohí J, Pellicer A, Horcajadas JA. Endometrial gene expression in the window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2011; 95: 2335-2341.
57. Luke B, Brown MB, Stern JE, Missmer SA, Fujimoto VY, Leach R. Female obesity adversely affects assisted reproductive technology (ART) pregnancy and live birth rates. *Human Reproduction* 2011; 26: 245-252.
58. Pandey S, Pandey S, Maheshwari A, Bhattacharya S. The impact of female obesity on the outcome of fertility treatment. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2010; 3: 62.
59. Sarfati J, Young J, Christin-Maitre S. Obesity and female reproduction. *Annales d'endocrinologie* 2010; 71: S49-S53.
60. Schmatz M, Madan J, Marino T, Davis J. Maternal obesity: the interplay between inflammation, mother and fetus. *Journal of Perinatology* 2010; 30: 441-446.
61. Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *The American Journal of the Medical Sciences* 2005; 330: 280-289.
62. Bohler H, Mokshagundam S, Winters SJ. Adipose tissue and reproduction in women. *Fertility and Sterility* 2010; 94: 795-825.
63. Crujeiras AB, Carreira MC, Cabia B, Andrade S, Amil M, Casanueva FF. Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sciences*, 2015.
64. VK Agarwal SK, Weistman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin-like factor-1 augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 1072-1076.
65. Spicer LJ, Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biology of Reproduction* 1998; 58: 207-212.
66. Erel CT, Senturk LM. The impact of body mass index on assisted reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2009; 21: 228-235.
67. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
68. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews* 2005; 85: 495-522.
69. Barreiro M, Gaytan F, Caminos J, Pinilla L, Casanueva F, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biology of Reproduction* 2002; 67: 1768-1776.

70. SJ Barreiro ML, Gaytán F, Pinilla L, Chopin LK, Casanueva FF, Diéguez C, Aguilar E, Toppari J, Tena-Sempere M. Developmental, stage-specific and hormonally regulates expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biology of Reproduction* 2003; 68: 1631-1640.
71. Barreiro M, Gaytan F, Castellano J, Suominen J, Roa J, Gaytan M, Aguilar E, Diéguez C, Toppari J, Tena-Sempere M. Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology* 2004; 145: 4825-4834.
72. Barreiro M, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 226: 1-9.
73. Caminos J, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado J, Barreiro M, Nogueiras R, Casanueva F, Aguilar E, Diéguez C. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 2003; 144: 1594-1602.
74. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva F. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89: 400-409.
75. Gaytan F, Morales C, Barreiro M, Jeffery P, Chopin L, Herington A, Casanueva F, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M. Expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a, the functional ghrelin receptor, in human ovarian surface epithelium, müllerian duct derivatives, and ovarian tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 90: 1798-1804.
76. García MC, Lopez M, Álvarez CV, Casanueva F, Tena-Sempere M, Diéguez C. Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction* 2007; 133: 531-540.
77. Bertoldi M, Luque E, Carlini V, Vincenti L, Stutz G, Santillán M, Ruiz R, de Cuneo MF, Martini A. Inhibitory effects of ghrelin on sexual behavior: role of the peptide in the receptivity reduction induced by food restriction in mice. *Hormone and Metabolic Research* 2011; 43: 494-499.
78. Tena-Sempere M. Ghrelin: novel regulator of gonadal function. *Journal of Endocrinological Investigation* 2004; 28: 26-29.
79. Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Miyazato M, Kaiya H. Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology* 2006; 147: 1333-1342.
80. Sabatini L, Young E, Inza R, Paz D, Marconi G, Lombardi E. Importancia de los niveles de Ghrelina, estado nutricional y BMI como marcadores predictivos de embarazo en un programa de FIV (fertilización in vitro). *Reproducción* 2009; 24: 51-55.
81. Carlini V, Martini A, Schiöth H, Ruiz R, De Cuneo MF, De Barioglio S. Decreased memory for novel object recognition in chronically food-restricted mice is reversed by acute ghrelin administration. *Neuroscience* 2008; 153: 929-934.
82. Goebel-Stengel M, Hofmann T, Elbelt U, Teuffel P, Ahnis A, Kobelt P, Lambrecht NW, Klapp BF, Stengel A. The ghrelin activating enzyme ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) is present in human plasma and expressed dependent on body mass index. *Peptides* 2013; 43: 13-19.
83. MH Tanaka K, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, Yoshida T, Kojima M, Kangawa K, and Toyoda N. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *Journal of Endocrinological Investigation* 2003; 88: 2335-2340.
84. Martin JR, Lieber SB, McGrath J, Shanabrough M, Horvath TL, Taylor HS. Maternal ghrelin deficiency compromises reproduction in female progeny through altered uterine developmental programming. *Endocrinology* 2011; 152: 2060-2066.
85. Du C, Li H, Cao G, Wang C, Li C. Expression of the Orexigenic Peptide Ghrelin and the Type 1a Growth Hormone Secretagogue Receptor in Sheep Oocytes and Pre implantation Embryos Produced In Vitro. *Reproduction in Domestic Animals* 2010; 45: 92-98.
86. Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T, Tanaka T. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 2003; 144: 2623-2633.
87. SL Tawadros N, Dimitriadis E, Chen C. Facilitation of decidualization by locally produced ghrelin in the human endometrium. *Molecular Human Reproduction* 2007; 13: 483-489.
88. WH Zhang K, Zhang YH, Wang SH, Li Y, Dai YP, Li N. Effects of ghrelin on in vitro development of porcine in vitro fertilized and parthenogenetic embryos. *Journal of Reproduction and Development* 2007; 53: 647-653.
89. Wang Z, Lin P, Yu S. Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of in vitro fertilized ovine embryos. *Theriogenology* 2013; 79: 695-701.
90. Luque EM, Torres PJ, de Loredó N, Vincenti LM, Stutz G, Santillán ME, Ruiz RD, de Cuneo MF, Martini AC. Role of ghrelin in fertilization, early embryo development, and implantation periods. *Reproduction* 2014; 148: 159-167.
91. Li L, Ferin M, Sauer MV, Lobo RA. Serum and follicular fluid ghrelin levels negatively reflect human oocyte quality and in vitro embryo development. *Fertility and Sterility* 2011; 96: 1116-1120.
92. Vidal C, Roa J, Pinilla L, Pellicer A, Tena-Sempere M. Maternal serum ghrelin levels in early IVF pregnancies: lack of prognostic value for viable pregnancy and altered post-prandial responses. *Human Reproduction* 2008; 23: 958-963.
93. Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva. Problemática actual de la fertilidad en la República Argentina (2015).
94. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HG, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Updated*, mp 048 (2010).

95. Moragianni VA, Jones SML, Ryley DA. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertility and Sterility* 2012; 98: 102-108.
96. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertility and Sterility* 2010; 93: 855-864.
97. Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, Roberts SA, Yates A, Pemberton P, Laing I. Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 2009; 92: 1586-1593.
98. Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LCL, Strauss JF. Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. *Fertility and Sterility* 2007; 87: 101-106.
99. Cancellor R, Clement K. Review article: Is obesity an inflammatory illness? Role of low grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynecology* 2006; 113: 1141-1147.
100. Cancellor R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Hen AB, Bedossa P. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 2006; 55: 1554-1561.
101. Pena-Bello L, Pertega-Diaz S, Outeiriño-Blanco E, Garcia-Buela J, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, Dieguez C, Cordido F. Effect of Oral Glucose Administration on Rebound Growth Hormone Release in Normal and Obese Women: The Role of Adiposity, Insulin Sensitivity and Ghrelin. *PloS One* 2015; 10.
102. Van Name M, Giannini C, Santoro N, Jastreboff AM, Kubat J, Li F, Kursawe R, Savoye M, Duran E, Dziura J. Blunted suppression of acyl ghrelin in response to fructose ingestion in obese adolescents: The role of insulin resistance. *Obesity* 2015; 23: 653-661.
103. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight 1. *Endocrine Reviews* 1999; 20: 68-100.
104. Rosicka M, Krsek M, Matoulek M, Jarkovska Z, Marek J, Justova V, Lacinova Z. Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiological Research* 2003; 52: 61-66.
105. Van Der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 426-457.
106. Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS. The influence of insulin on circulating ghrelin. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 2003; 284: E313-E316.
107. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH. Jr Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 2002; 143: 185-190.
108. Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003; 88: 2180-2184.
109. Martin B, Pearson M, Kebejian L, Golden E, Keselman A, Bender M, Carlson O, Egan J, Ladenheim B, Cadet JL. Sex-dependent metabolic, neuroendocrine, and cognitive responses to dietary energy restriction and excess. *Endocrinology* 2007; 148: 4318-4333.
110. Alosco ML, Spitznagel MB, Strain G, Devlin M, Cohen R, Crosby RD, Mitchell JE, Gunstad J. Improved Serum Leptin and Ghrelin Following Bariatric Surgery Predict Better Postoperative Cognitive Function. *Journal of Clinical Neurology* 2015; 11: 48-56.
111. Wright SM, Aronne LJ. Causes of obesity. *Abdominal Imaging* 2012; 37: 730-732.
112. Bray GA, Bouchard C. *Handbook of Obesity: Clinical Applications*. CRC Press vol 2, 2014.
113. Kweh FA, Miller JL, Sulsona CR, Wasserfall C, Atkinson M, Shuster JJ, Goldstone AP, Driscoll DJ. Hyperghrelinemia in Prader Willi syndrome begins in early infancy long before the onset of hyperphagia. *American Journal of Medical Genetics* 2015; 167: 69-79.
114. Irizarry KA, Bain J, Butler MG, Ilkayeva O, Muehlbauer M, Haqq AM, Freemark M. Metabolic profiling in Prader-Willi syndrome and nonsyndromic obesity: sex differences and the role of growth hormone. *Clinical Endocrinology* (2015).
115. Lacroix D, Moutel S, Coupaye M, Huvenne H, Faucher P, Pelloux V, Rouault C, Bastard JP, Cagnard N, Dubern B. Metabolic and Adipose Tissue Signatures in Adults With Prader-Willi Syndrome: A Model of Extreme Adiposity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014; 100: 850-859.
116. Janssen I, Heymsfield SB, Allison DB, Kotler DP, Ross R. Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal subcutaneous, and visceral fat. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 75: 683-688.
117. Brambilla P, Bedogni G, Heo M, Pietrobelli A. Waist circumference-to-height ratio predicts adiposity better than body mass index in children and adolescents. *International Journal of Obesity* 2013; 37: 943-946.
118. Gómez-Ambrosi J, Silva C, Galofré J, Escalada J, Santos S, Millán D, Vila N, Ibañez P, Gil M, Valentí V. Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *International Journal of Obesity* 2012; 36: 286-294.

119. Zhang D, Zhu Y, Gao H, Zhou B, Zhang R, Wang T, Ding G, Qu F, Huang H, Lu X. Overweight and obesity negatively affect the outcomes of ovarian stimulation and in vitro fertilisation: a cohort study of 2628 Chinese women. *Gynecological Endocrinology* 2010; 26: 325-332.
120. Sathya A, Balasubramanyam S, Gupta S, Verma T. Effect of body mass index on in vitro fertilization outcomes in women. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2010; 3: 135.
121. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 2010; 139: 685-695.
122. Robker RL. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology* 2008; 15: 115-121.
123. Spandorfer SD, Kump L, Goldschlag D, Brodtkin T, Davis OK, Rosenwaks Z. Obesity and in vitro fertilization: negative influences on outcome. *The Journal of Reproductive Medicine* 2004; 49: 973-977.
124. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertility and Sterility* 2008; 90: 714-726.
125. Awartani KA, Nahas S, Al Hassan SH, Al Deery MA, Coskun S. Infertility treatment outcome in sub groups of obese population. *Reproduction Biology and Endocrinology* 2009; 7: 52.
126. Jungheim ES, Lanzendorf SE, Odem RR, Moley KH, Chang AS, Ratts VS. Morbid obesity is associated with lower clinical pregnancy rates after in vitro fertilization in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2009; 92: 256-261.
127. Sneed ML, Uhler ML, Grotjan HE, Rapisarda JJ, Lederer KJ, Beltsos AN. Body mass index: impact on IVF success appears age-related†. *Human Reproduction* 2008; 23: 1835-1839.
128. Dechaud H, Anahory T, Reyftmann L, Loup V, Hamaiah S, Hedon B. Obesity does not adversely affect results in patients who are undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006; 127: 88-93.
129. Lintsen A, Pasker-de Jong P, de Boer E, Burger C, Jansen C, Braat D, Van Leeuwen F. Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Human Reproduction* 2005; 20: 1867-1875.
130. Vilarino FL, Christofolini DM, Rodrigues D, de Souza AM B, Christofolini J, Bianco B, Barbosa CP. Body mass index and fertility: is there a correlation with human reproduction outcomes? *Gynecological Endocrinology* 2011; 27: 232-236.