



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado “Biología Funcional y Molecular”

Efecto de la obesidad abdominal, la resistencia a insulina y la leptina intrafolicular en la fecundación “in vitro”

Tesis Doctoral

David Llana Suárez

Oviedo 2014



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado “Biología Funcional y Molecular”

Efecto de la obesidad abdominal, la resistencia a insulina y la leptina intrafolicular en la fecundación “in vitro”

Tesis Doctoral

David Llana Suárez

Oviedo 2014

Agradecimientos:

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que de algún modo han colaborado en la realización de este trabajo:

En primer lugar a los profesores Celestino González y Placido Llana por darme esta oportunidad para entrar en el fascinante mundo de la investigación. Muchísimas gracias por vuestra confianza, paciencia, consejos y por estar siempre ahí ya fuera para escuchar mi sin fin de preguntas o para dar ánimos.

A toda la unidad de FIV del Hospital Universitario Central de Asturias, por no sólo permitirme y ayudarme en la realización de este proyecto, sino también por enseñarme las bases de este mundo maravilloso que es la Reproducción Humana. En especial me gustaría mencionar a Vanesa, por todas esas veces que me sacaste las castañas del fuego en aquellos primeros momentos, en la que los nervios me podían y perdía los estribos. Por todas esas veces en las que me ayudaste con las muestras por estar siempre, ahí con una sonrisa, por enseñarme de que iban los congresos y por un sin fin de cosas más que seguro que se me olvidan muchísimas gracias de corazón.

A todo el personal del laboratorio de fisiología del departamento de Biología Funcional por su amabilidad y ayuda. En especial a Pablo, Javi y Estefanía por todos esos cables con el procesamiento de las muestras, por enseñarme a dar los primeros pasos en un laboratorio de biología molecular y por todas esas horas de paciencia y amabilidad.

A la empresa CEFIVA y en especial a los Doctores Carlos Ochoa y Pedro de la Fuente por saber reconocer la importancia de este proyecto y por la oportunidad de poder seguir trabajando en este campo. Esperemos que sea el principio de otros muchos proyectos.

A todos mis amigos ya sean lejanos o cercanos: Sergio, Noe , Jose, Lu, Leti, Ele, Olga, Crespo, Miki, Esther... que por el simple hecho de escuchar, de estar ahí, de darme ánimos, han sido capaces de hacer que este proyecto fuera muchísimo menos duro.

A toda mi familia por todos esos ánimos, horas de paciencia, en especial a mi padre por enseñarme no sólo los primeros pasos en la investigación, por estar siempre ahí para resolver dudas sin importar la hora y el día, por tu santa paciencia ante los mil problemas que le planteaba, por los mil y un consejos, pero sobretodo por darme ánimos y recordarme lo que es importante. Mi madre y mi hermana también requieren una mención especial ya que siempre supieron apoyarme y calmarme en todos aquellos momentos de desesperación, sin vosotros no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

Y a todas esas personas que se cruzaron conmigo a lo largo de este tiempo que me sacaron una sonrisa y me dieron algún consejo muchísimas gracias.

ÍNDICE:

I. Introducción.	
I.1. El problema del descenso de la fertilidad, el retraso de la maternidad y la obesidad.....	1
I.2. Técnicas de reproducción asistida: Fecundación “In Vitro”.....	5
I.3. Obesidad central, Adipotoxicidad y Síndrome Metabólico. Influencia en las técnicas de FIV.....	10
I.4. Insulina y Leptina en la reproducción humana	
I.4.1 Insulina.....	12
I.4.2. Leptina.....	17
I.4.3 Obesidad, Resistencia a la Insulina, Leptina y Reproducción Humana.....	20
II. Hipótesis.....	22
III. Objetivos del estudio	
III.1 Objetivo principal.....	23
III.2 Objetivos secundarios.....	23
IV. Material y métodos	
IV.1 Tipo de estudio.....	24
IV.2. Cálculo del tamaño de la muestra.....	24

IV.3. Sujetos del Estudio.....	25
IV.4. Valoración clínica de las pacientes.....	26
IV.5. Protocolo de estudio clínico y analítico.....	27
IV.6. Protocolos de estimulación ovárica empleados y monitorización.....	28
IV.7 Variables incluidas en el estudio.....	31
IV.8. Análisis estadísticos.....	33
IV.9.Consideraciones éticas.....	34
V. Resultados	
V.1. Descripción y análisis exploratorios de la muestra.....	35
V.2. Análisis univariantes y bivariantes para subgrupos.....	39
V.3. Modelos multivariantes análisis ROC y estudios de sensibilidad y especificidad. Desarrollo de un modelo predictivo de posibilidad de embarazo.....	54
VI. Discusión.....	59
VII. Conclusiones.....	72
VIII. Bibliografía.....	74
IX. Abreviaturas.....	97

I. INTRODUCCIÓN

I.1. El problema del descenso de la fertilidad, el retraso de la maternidad y la obesidad

El fenómeno natural del embarazo y el desarrollo evolutivo de la viviparidad es un proceso complejo para el que se requieren unos gametos sanos, un tiempo exacto para la interacción de esos gametos y un útero receptivo, por tanto es necesario superar muchas barreras para que un embarazo pueda finalizar con éxito. En humanos la probabilidad de concebir es de alrededor del 25-30% por ciclo y sólo el 50% de esas concepciones avanzan más allá de la 20 semana de gestación (Laufer, Simon 2012) .

Dentro de las causas de esterilidad relacionadas con la mujer, el retraso de la maternidad y el exceso de peso son dos factores importantes que contribuyen a explicar el incremento de los problemas de fertilidad en el momento actual (Petraglia, Serour y Chapron 2013). La evolución de la sociedad en los países occidentales y la creciente incorporación de la mujer en la vida profesional ocasionan cambios en el estilo de vida y plantean nuevos problemas biológicos cuya trascendencia para el futuro de la propia sociedad es difícil de predecir. La necesidad de mayor formación y las dificultades del mercado laboral obligan a muchas mujeres jóvenes a optar por posponer su maternidad hasta cumplir sus expectativas laborales.

En la figura 1 se muestra la evolución del retraso en la edad de la maternidad en España durante los últimos años, de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística.

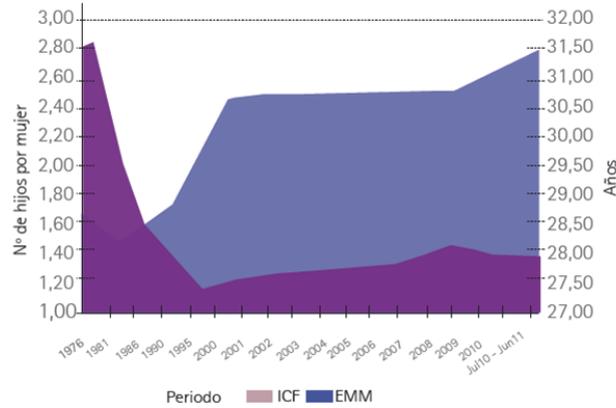


Figura 1.- Indicador coyuntural de fecundidad (ICF) y edad media de la maternidad (EMM) en España.

Tomado de: INE, 2012

Esta relación entre el descenso de la fertilidad y el retraso en la edad de la maternidad es bien conocida y se explica fácilmente, ya que el ovario es un órgano que va agotando su reserva de oocitos a medida que transcurren los años, tal como se muestra en la figura 2. Además, los problemas en la disyunción meiótica y de inestabilidad de microsátélites de los oocitos también aumentan a medida que se envejece, con lo que la incapacidad para lograr un niño sano se eleva (Woods, Telfer y Tilly 2012).

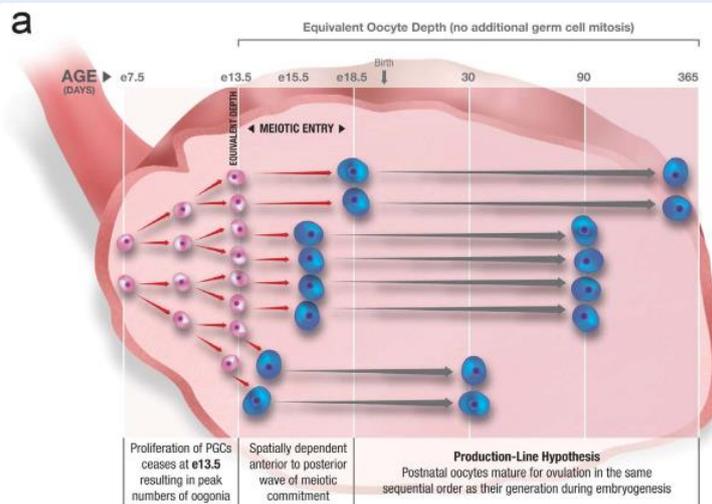
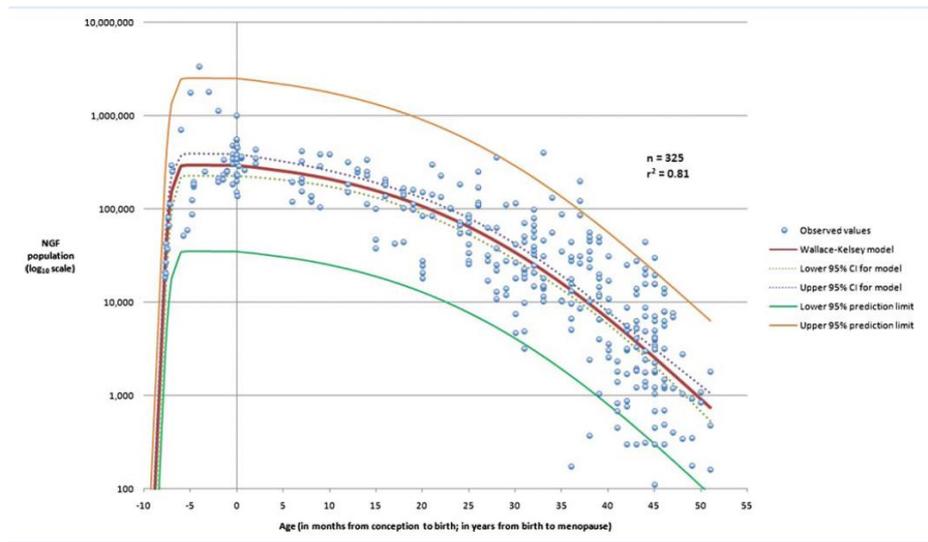


Figura 2.- Evolución de la dotación de folículos primordiales a lo largo de la vida e hipótesis del reloj biológico o producción en línea de los folículos que son seleccionados para la maduración y ovulación en la misma secuencia y orden en que fueron generados durante la vida fetal.

Modificado de Woods, 2012

El envejecimiento del resto de los órganos relacionados con la reproducción y los cambios en la sexualidad asociados a la edad también contribuyen a la disminución de la fertilidad a medida que se envejece, de modo que las posibilidades de reproducirse

disminuyen de manera muy importante después de los 35 años, en donde la probabilidad de que una mujer sea infértil suelen superar el 30% (Menken, Trussell y Larsen 1986).

El paso del tiempo también se asocia con una mayor probabilidad de aumentar la reserva de grasa en el organismo y de acumularla en lugares anormales, especialmente en los países industrializados donde son comunes el consumo de dietas hiperprotéicas y el escaso ejercicio físico (Wientzek y cols. 2013). La Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad registró un incremento en la tasa de obesidad en las mujeres después de los 35 años, mostrándose en la figura 3 la probabilidad de obesidad en relación a la edad.

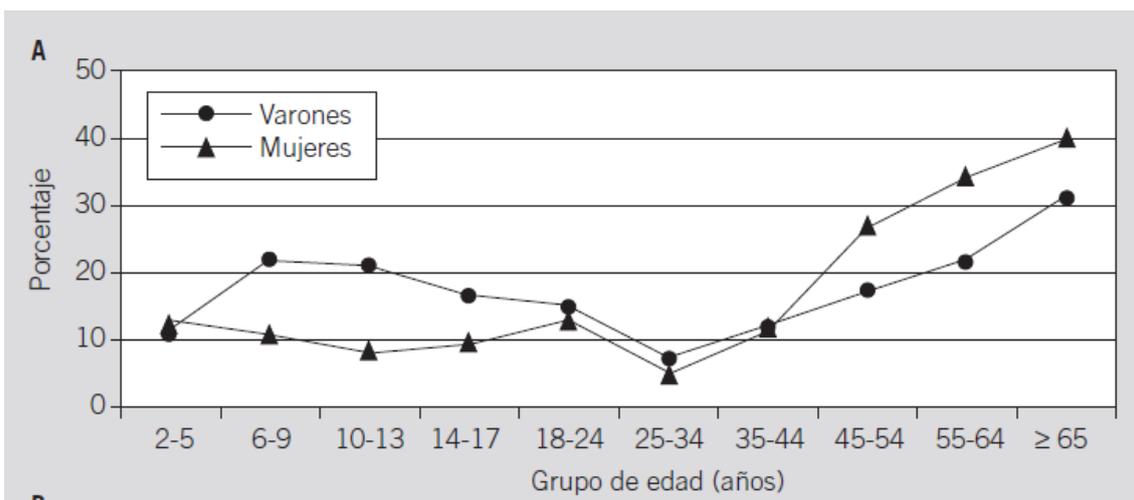


Figura 3.- Distribución geográfica, por sexo y por grupos de edad de la obesidad en nuestro país según el estudio Dorica.

Tomado de: Aranceta y cols. 2005

I.2 Técnicas de reproducción asistida: Fecundación “In Vitro”

Las TRA son una esperanza para muchas parejas que se enfrentan a un problema de fertilidad, pero su tasa de éxitos dista de ser óptima. En general, los resultados de las TRA reproducen de forma especular los malos datos observados en la reproducción natural para la edad y para el exceso de peso.

Las diferentes formas de fecundación “in vitro” (FIV) se basan en someter a los ovarios a una manipulación hormonal o estimulación ovárica controlada (EOC) para producir numerosos folículos que originarán niveles suprafisiológicos de estrógenos. Una vez que los folículos alcanzan un tamaño superior a los 16-18 mm son puncionados a través de la vagina, mediante visualización ecográfica, y los oocitos obtenidos se ponen en contacto con los espermatozoides en la técnica de FIV clásica o microinyectando el gameto masculino en el interior del oocito según la técnica de microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Se obtiene así un embrión que se transfiere a las 48-72 horas al interior de la matriz, a través del cérvix uterino.

En contraste con el ciclo normal, al utilizar estas técnicas los gametos y embriones están expuestos a un medio de cultivo y condiciones artificiales y, además, los embriones se transfieren en un estadio precoz de división, esperando que se desarrolle en el útero antes de alcanzar la sincronización con un endometrio receptivo. Es pues, un proceso complejo en el que alteraciones sutiles pueden ocasionar su fracaso.

En condiciones normales, la tasa de éxito de la FIV-ICSI oscila entre el 23% y el 44%, según se considere un solo intento o varios intentos sucesivos (Pouly y cols. 2012) relacionándose el éxito con diversas variables como: una pobre respuesta ovárica (PRO) a la EOC, la calidad del oocito recuperado, el número de oocitos fertilizado, la calidad del oocito y/o del embrión, etc.

La influencia negativa de la edad y del exceso de masa grasa en los resultados de la FIV-ICSI, supone un importante gasto económico y emocional para aquellas parejas que no logran la gestación, siendo común en las pacientes que lo presentan que el ovario responda mal al estímulo hormonal, es decir, que las pacientes padezcan una pobre respuesta ovárica (PRO) (Freeman y cols. 2007).

Se sabe que el número de oocitos recuperados y la calidad de los mismos tras la EOC se ve influenciada por diversos factores como: el genoma nuclear y mitocondrial o el microambiente ovárico, pero también pueden verse alterados por la edad y la obesidad (Rienzi y cols. 2012). Un oocito maduro ideal (metafase II) debería de presentar un citoplasma de apariencia normal, un único corpúsculo polar, un grosor de la membrana pelúcida adecuado y un espacio perivitelino normal (Swain y Pool 2008), tal y como se muestra en la figura 4.

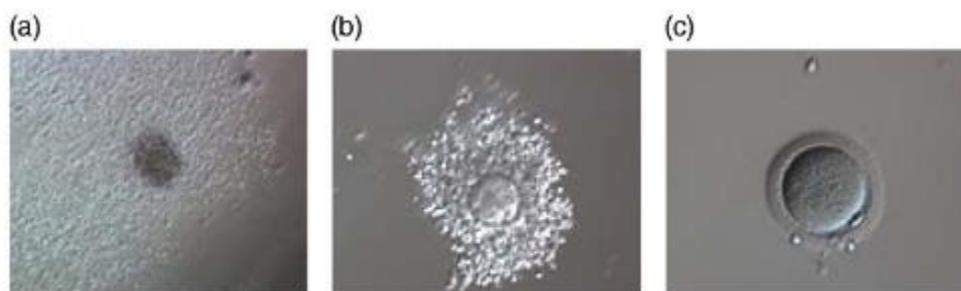


Figura 4.- Denudación de un oocito previo a la ICSI. En la figura 4C se puede observar un oocito en metafase II (caracterizado por la presencia del corpúsculo polar) único estado de maduración adecuado para realizar esta técnica.

Tomado de: Rienzi y cols. 2012

La captación de oocitos anormales conllevará a que las posibilidades de fertilización sean más bajas o a que la formación de embriones anormales sea más elevada (Nagy y cols. 2003). En condiciones normales, la transición hacia cigoto es inducida por la penetración del espermatozoide, por oscilaciones de calcio en el oocito y por una serie de grandes cambios en las señales moleculares que controlan el arresto meiótico (Ajduk y cols. 2011). En humanos, el centriolo espermático tiene un papel principal en la organización de los microtúbulos que dirigen la migración y rotación de los pronúcleos en el citoplasma (Gianaroli y cols. 2003).

Las características morfológicas del cigoto son indicadoras del potencial implantatorio del embrión (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011) y la mayoría de los laboratorios de reproducción basan la valoración de la calidad de los embriones en los parámetros morfocinéticos durante el estadio de división. Estos sistemas de clasificación están basados en la valoración del número de blastómeras, la simetría de las mismas, el grado

de fragmentación, la presencia de multinucleación y el grado de compactación (Holte y cols. 2007).

Los embriones de calidad elevada presentan una cinética y sincronía adecuadas a la hora de dividirse, produciéndose una división celular cada 18-20h (Magli y cols. 2007), pudiendo influir en el proceso el ambiente específico del laboratorio, los medios de cultivo y la temperatura (Munne 2006).

En la figura 5 se resumen los criterios más aceptados para la clasificación de embriones propuesto por ASEBIR con arreglo a 4 categorías de la A a la D según el potencial implantatorio del embrión:

- Categoría A: Corresponde a los embriones de máxima calidad con el mayor potencial de implantación.
- Categoría B: Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.
- Categoría C: Embrión con una capacidad de implantación media.
- Categoría D: Embrión de mala calidad con un potencial implantatorio bajo.

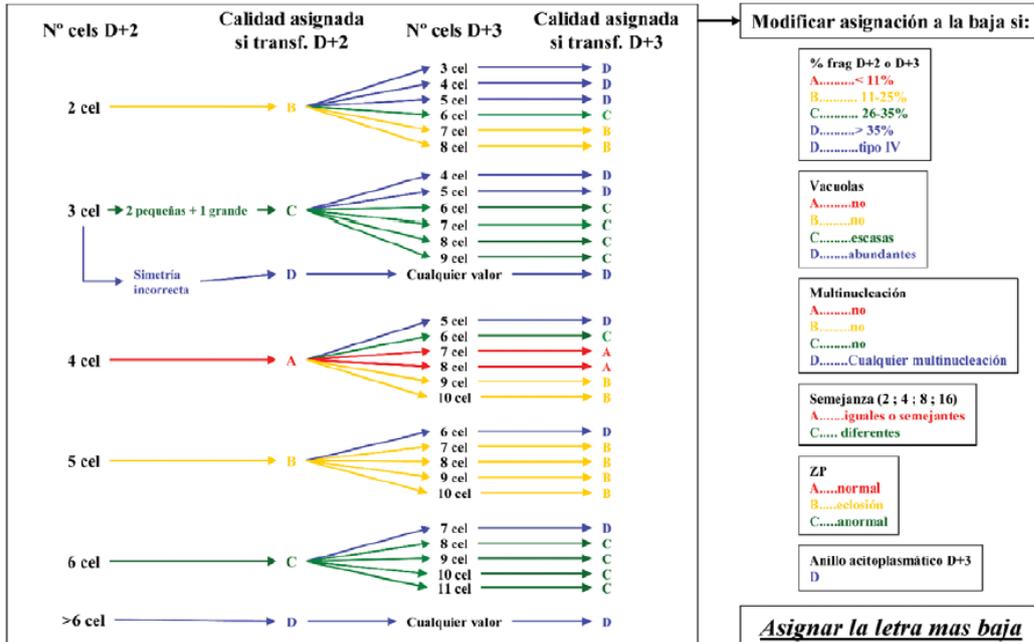


Figura 5.- Sistema de clasificación de embriones en división de ASEBIR.

Tomado de: ASEBIR Cuaderno de Embriología Clínica

La transferencia embrionaria a través del cérvix es un proceso sencillo, pero que precisa de la habilidad del ginecólogo que la realiza y que puede presentar más dificultades en las pacientes obesas al tener una peor visualización del cuello uterino y una transmisión de ultrasonidos más deficiente para guiar el paso del catéter con la ecografía.

Tras la transferencia embrionaria se asiste al complejo proceso de implantación en el que se distinguen cuatro fases distintas, relacionadas y consecutivas: aposición, adhesión, rotura de la barrera epitelial e invasión. Todo este proceso está regulado por multitud de factores que actúan de forma endocrina, paracrina, autocrina y yuxtacrina, tanto a nivel endometrial como embrionario (Horcajadas y cols. 2004) y se conoce que

tanto la edad (Altnae y cols. 2014) como los cambios asociados al acúmulo anormal de grasa en el organismo pueden alterarlo (Bellver y cols. 2013).

I.3 Obesidad central, Adipotoxicidad y Síndrome Metabólico. Influencia en las técnicas de FIV

A pesar de que el IMC es el parámetro estándar recomendado por la OMS y diversas sociedades científicas para definir los límites del sobrepeso y de la obesidad, varios autores consideran que dicho parámetro no refleja con exactitud el exceso de grasa, al incluir en su determinación la masa magra y la masa grasa. Así, para conocer el estado metabólico real de una persona realizar un estudio de la composición corporal y de la distribución de la grasa en el organismo resultaría más preciso. Sin embargo, la determinación de la composición corporal precisa de una tecnología que no siempre puede estar disponible, por lo que el uso de un parámetro antropométrico sencillo como es la determinación de la circunferencia abdominal (CA), se usa cada vez más en la clínica al ser un parámetro que se relaciona bien con la cantidad de grasa acumulada a nivel central (Moore 2009). De hecho, el acúmulo de grasa a nivel troncular o central, definido también como obesidad abdominal, se diagnostica por un aumento de la CA. La Federación Internacional de Diabetes (Eckel, Grundy y Zimmet 2005) y la Organización Mundial de la Salud (Anónimo 2000) consideran un valor mayor o igual a 80cm de CA como el límite para el diagnóstico de obesidad abdominal en las mujeres europeas, mientras que esta cifra se eleva a los 88 para las mujeres americanas, según sugiere el ATPIII (Anónimo 1998).

Aunque tradicionalmente el tejido adiposo, concretamente la grasa abdominal, ha sido visto como un órgano inerte cuya única función era el almacenamiento de energía, hoy se considera como el mayor órgano endocrino del cuerpo humano. El depósito ectópico de lípidos puede provocar un efecto negativo en el metabolismo de la glucosa o “lipotoxicidad” y puede modificar la producción de adipoquinas que ocasionarán inflamación crónica y alteración de la función de diversos sistemas a lo que se ha denominado “adipotoxicidad” (Nakao 2009). Estas alteraciones hormonales y cambios metabólicos asociados son la base del denominado síndrome metabólico (Alberti y cols. 2009), cuyas características se muestran en la tabla I.

Criterios para el diagnóstico clínico del Síndrome metabólico	
Medida	Punto de Corte Categórico
Circunferencia abdominal elevada	Definidos por la población y el país específico
Triglicéridos elevados (el tratamiento con medicamentos para los triglicéridos elevados es un indicador alternativo)	≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L)
HDL-C Reducido (el tratamiento con medicamentos para el HDL-C Reducido es un indicador alternativo)	< 40 mg/dL (1,0 mmol/L) en hombres < 50 mg/dL (1,3 mmol/L) en mujeres
Elevada presión arterial (el tratamiento con medicamentos antihipertensivos en pacientes con una historia de hipertensión es un indicador alternativo)	Sistólica ≥ 130 y/o diastólica ≥ 85 mm Hg
Elevada glucosa disponible (el tratamiento con medicamentos para la glucosa elevada es un indicador alternativo)	≥ 100 mg/dL

Tabla I.- Resumen de los criterios para diagnosticar un Síndrome Metabólico.

Modificado de: Alberti y cols. 2009

Algunos estudios han sugerido que los malos resultados en FIV observados en las mujeres obesas podrían obedecer de algún modo a la presencia de una resistencia a la insulina (RI) o a los niveles elevados de leptina sérica que presentan las mujeres con CA aumentada (Bohler, Mokshagundam y Winters 2010) ya que estudios en animales han demostrado el importante papel de estas dos hormonas a varios niveles (Codner, Merino y Tena-Sempere 2012).

I.4. Insulina y Leptina en la reproducción humana

I.4.1 Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos que se produce y secreta principalmente por las células beta de los islotes de Langherans en el páncreas. En la especie humana el gen responsable de su producción se ha localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (Harper, Ullrich y Saunders 1981). Como resultado de la transcripción de dicho gen en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso, se genera un péptido conocido como pre-proinsulina que, tras sufrir un proceso de sulfo-oxidación, origina el péptido denominado pro-insulina, el cual es escindido mediante cortes proteolíticos originando como producto final cantidades equimolares de insulina y péptido-C que son liberados al exterior de la célula. La insulina está formada por dos cadenas polipeptídicas denominadas A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos) unidas entre sí por puentes disulfuros, tanto intra como intercatenarios (Huang y cols. 2005).

El mecanismo que regula la biosíntesis y secreción de la insulina no se conoce completamente, pero se sabe que depende de los niveles de glucosa y de los productos intermediarios de su metabolismo, así como de los ácidos grasos y de la propia hormona (Poitout y cols. 2006). Entre los diversos factores implicados cabe destacar a la grasa corporal con una relación bidireccional ya que, a su vez, la insulina actúa directamente sobre el cerebro como un factor de saciedad regulando el peso corporal y el gasto de energía (Alvarez-Castro y cols. 2011).

La resistencia a la insulina (RI) es un estado en que las concentraciones normales de insulina producen una respuesta biológica atenuada (Krentz y Natrass 1996). Su diagnóstico en la clínica es controvertido. Algunos test capaces de medir con gran precisión esta situación como el anclaje euglicémico-hiperinsulinémico son considerados como métodos óptimos, pero resultan muy complejos de realizar, por lo que no resultan prácticos para trabajar en humanos. Como alternativa a dichas pruebas se han propuesto un variado número de índices subrogados que son comúnmente empleados en la clínica para evaluar la sensibilidad y la RI (Singh y Saxena 2010).

Dentro de estos últimos test, la determinación de los niveles séricos de insulina puede ser una primera aproximación práctica (Thomas y cols. 2000). La relación de glucosa/insulina, aunque teóricamente es un índice imperfecto, para algunos autores sería un marcador sensible (Legro, Finegood y Dunaif 1998). Finalmente, el HOMA-IR (Matthews y cols. 1985) es el método más usado, ya que se demostró que tiene una buena correlación con la RI (Chen y cols. 2003). Se trata de una ecuación matemática en la que el producto de los niveles séricos de glucosa e insulina en ayunas se multiplican por una constante [HOMA-IR = (glucose × insulina)/22,5].

Estudios realizados por Wu y colaboradores (Wu y cols. 2012) en ratones obesos que exhiben RI han observado que las rutas de señalización de la insulina son diferentes en los distintos tejidos según el animal objeto de la experimentación sea obeso o no. Así por ejemplo, tal como se muestra en la figura 7, en la rata obesa la respuesta hipofisaria a la insulina es a través de IRS2, pero no a través de IRS1, aunque en el ovario la respuesta es a través de ambas moléculas de señalización.

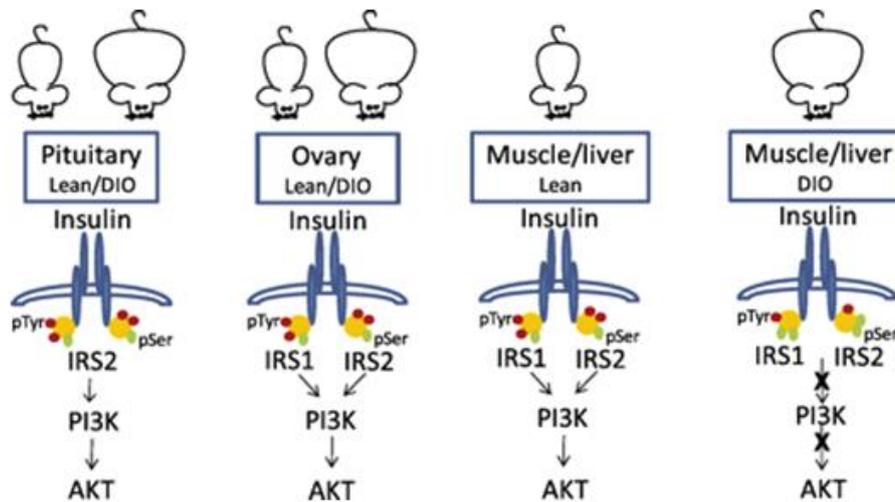


Figura 7.- Resumen de las vías de señalización de la insulina en diversos tejidos en ratones delgados y con obesidad inducida.

Tomado de: Wu, 2012

La acción de la insulina sobre el ovario está determinada por un complejo sistema que incluiría a la insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), tipo II (el IGF-II), el IR, los receptores del IGF-I e IGF-II, las proteínas de unión de los IGF a su receptor (IGFBPs) y las IGFBPs proteasas (Brogan y cols. 2010), siendo su funcionamiento diferente según la especie y pudiendo variar en distintas

circunstancias fisiológicas o patológicas (Poretsky y cols. 1999b), tal como se muestra en la figura 8.

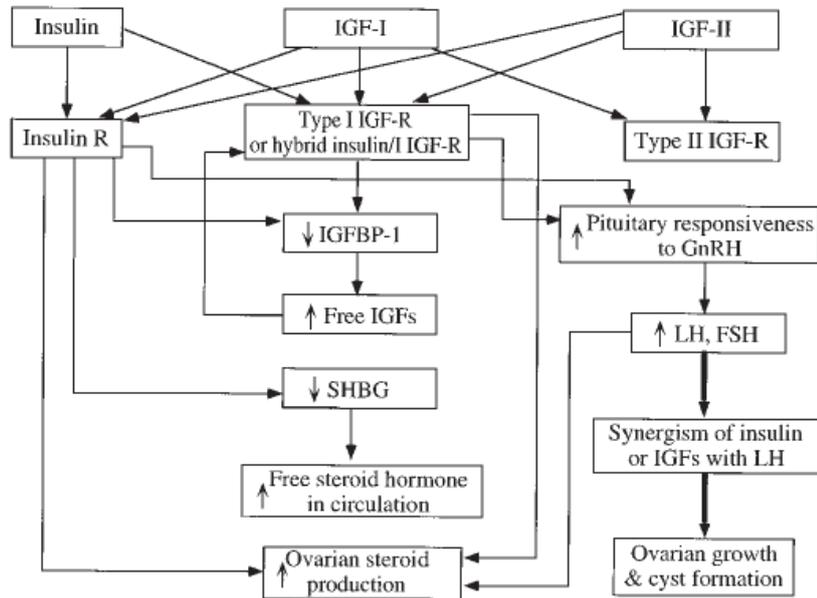


Figura 8.- Relación entre los distintos componentes del sistema regulación del complejo relacionado con la insulina en el ovario.

Tomado de: Poretsky y cols. 1999b

La insulina actúa también en el complejo proceso de reclutamiento y desarrollo folicular. Los niveles de insulina elevados de forma crónica juegan un papel en el aumento de los folículos antrales y en el desarrollo morfológico típico del síndrome del ovario poliquístico (SOP) (Monget y Bondy 2000). Su papel en las mujeres que no padecen SOP es menos claro (Dickerson y cols. 2010b), aunque estudios en animales han demostrado que los niveles elevados de insulina pueden tener un efecto deletéreo sobre la maduración de los oocitos (Vlaisavljevic, Kovac y Sajko 2009), probablemente por una disfunción mitocondrial tras aumentar el estrés oxidativo (Ou y cols. 2012b). Cuando la insulina se encuentra en niveles normales parece tener un papel en la

transición de folículos primordiales hasta folículos primarios (Kezele, Nilsson y Skinner 2002), en el incremento en el número de receptores de LH y en la capacidad de unión al ligando de dicho receptor en las células de la granulosa (Poretsky y cols. 1999b).

El efecto de la insulina en los folículos desarrollados por el estímulo de la FSH parece estar mediado por el sistema IGF (Kwintkiewicz y Giudice 2009). Se conoce que la insulina guarda una estrecha relación con el IGF-II presente en las células de la granulosa, jugando un papel crítico para la correcta respuesta de estas células a las gonadotrofinas (Mason y cols. 1994).

En mujeres, que no presentan SOP, la insulina también actúa sobre las células de la teca de forma sinérgica con la LH para la producción de andrógenos (Magoffin y Weitsman 1994) con un efecto dosis dependiente (Bergh y cols. 1993). En las mujeres que presentan SOP los niveles elevados de insulina de forma crónica ocasionan anovulación (Tingthanatikul y cols. 2006). La insulina actúa sinérgicamente con la LH para aumentar la producción de andrógenos en las células de la teca ovárica, contribuyendo también a aumentar la secreción adrenal de andrógenos e inhibiendo la síntesis de SHBG en el hígado con lo que se incrementa aún más los niveles de testosterona libre (Adashi, Hsueh y Yen 1981), tal como se muestra de forma esquemática en la figura 9.

En las células de la granulosa la insulina parece actuar como una co-gonadotrofina en las mujeres que presentan SOP (Mason y cols. 1994), habiéndose demostrado que la incubación de células de la granulosa humana con insulina aumenta su respuesta a la LH (Willis y cols. 1996) y que esta acción podría ser anulada por el uso de fármacos que mejoran la sensibilidad a la insulina (Azziz y cols. 2003).

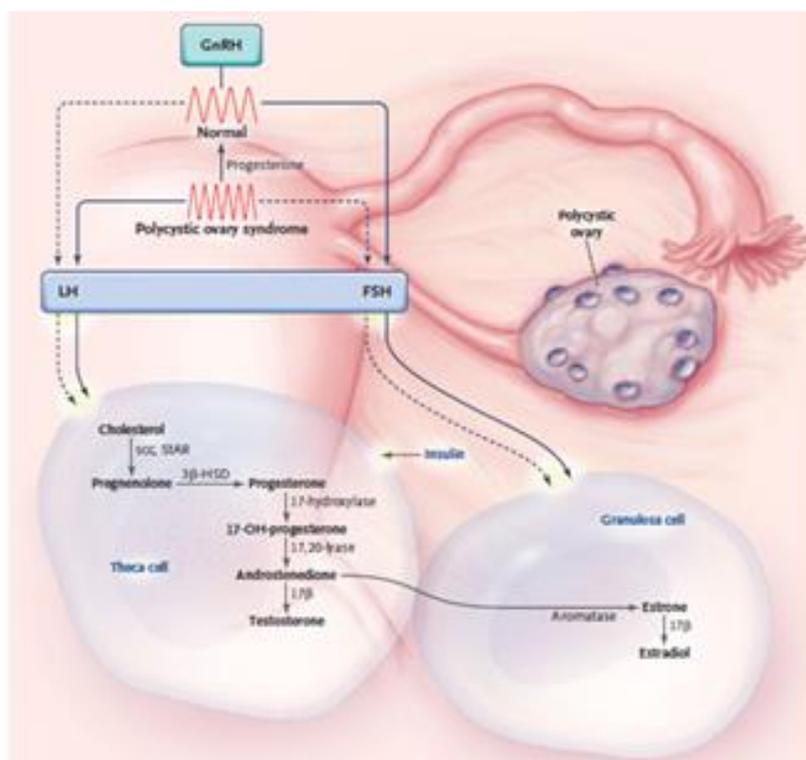


Figura 9.- Esquema del mecanismo de acción de la insulina en las mujeres con SOP.

Tomado de: Ehrmann, 2005

I.4.2. Leptina

La leptina es una proteína sintetizada por el tejido adiposo que se ha relacionado con la ingesta de alimentos, el balance energético, la inmunidad y la fecundidad. Desde un punto de vista biológico, es una hormona polipeptídica de 167 aminoácidos de 16kDalton cuya producción es regulada en humanos por el gen LEP. Además de en el tejido adiposo blanco, se puede producir leptina en el tejido adiposo marrón, el tejido linfoide, la médula ósea, el epitelio mamario, los ovarios, el músculo esquelético y la placenta (Margetic y cols. 2002).

En general, se considera que los niveles sanguíneos de leptina sirven como indicador de la cantidad de energía acumulada en el cuerpo, siendo fundamental que se mantengan en niveles adecuados para el proceso de la regulación de la homeostasis energética, al informar al cerebro sobre el estado nutricional del organismo. Junto con las señales de insulina, otros neurotransmisores y nutrientes, el hipotálamo es capaz de orquestar la supresión del apetito (Schwartz y cols. 2000).

La leptina ejerce su efecto a través de la unión y la activación de un receptor específico que está codificado por el gen LEPR en humanos y que está presente en el sistema nervioso central, especialmente en el hipotálamo, los riñones, el pulmón, los linfocitos, el tejido adiposo, la próstata, los ovarios, el hígado, el intestino delgado y el corazón (Clement y cols. 1998).

En las situaciones en las que hay un exceso de ingesta calórica que conduce a la obesidad, se observa una hiperleptinemia que refleja una tolerancia o resistencia a la leptina. En estos individuos la respuesta anoréctica a la leptina está disminuida debido a diversas alteraciones en la transcripción y señalización a nivel celular.

La producción de leptina en humanos depende, por tanto, de la proporción de tejido adiposo almacenado. Cambios agudos en la ingesta calórica se asocian con variaciones en los niveles de leptina circulantes. Dichos niveles se pueden ver también influenciados por los niveles de esteroides sexuales (Blüher, Mantzoros 2009). En este sentido, se ha observado que cuando existe una mutación en el gen de la leptina o del receptor de leptina, además de desarrollar obesidad se observa un deterioro de la función reproductiva.

La secreción de leptina parece seguir un patrón circadiano, de modo que las concentraciones son más bajas en los primeros momentos de la tarde y más altas alrededor de la medianoche (Shea y cols. 2005). También se conoce que posee una secreción pulsátil, siendo la amplitud de los pulsos mayor en los individuos obesos (Licinio y cols. 1997). En las mujeres se observan cambios en las concentraciones de leptina durante las distintas fases del ciclo ovárico, siendo más altas durante la fase lútea del ciclo (Asimakopoulos y cols. 2009). La figura 10 resume de forma esquemática las posibles influencias de la leptina en el proceso reproductivo (Tersigni y cols. 2011).

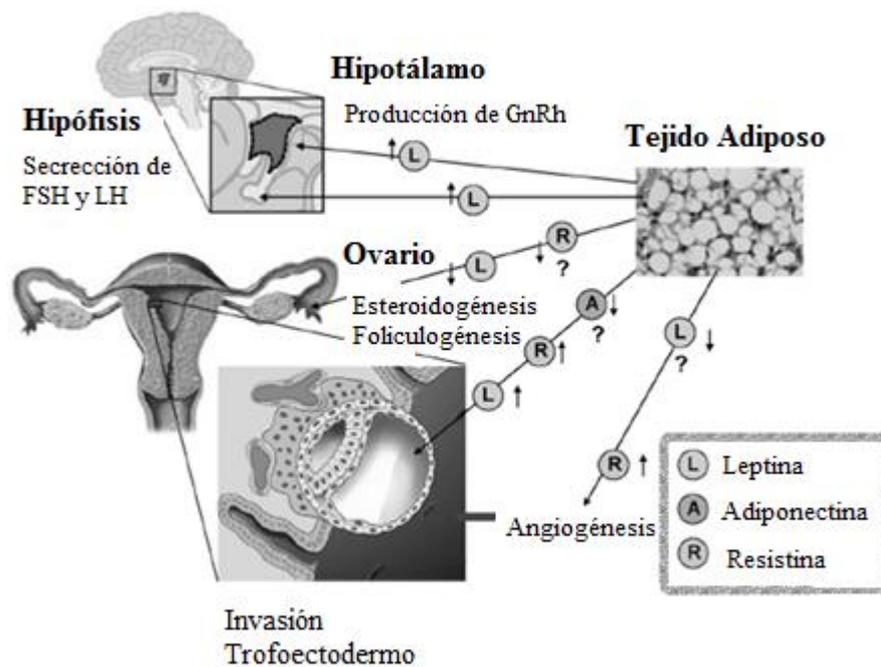


Figura 10.- Esquema de la acción de la leptina y otras adipoquinas en las distintas fases del proceso reproductivo.

Modificado de: Tersigni, 2011

I.4.3 Obesidad, Resistencia a la insulina, Leptina y Reproducción Humana

La relación entre obesidad, RI y leptina es bien conocida desde hace años. La insulina puede aumentar la masa grasa por su efecto lipogénico y facilitar la secreción de leptina desde los adipocitos (Barr y cols. 1997) y, por otro lado, la leptina puede inhibir o estimular la secreción de insulina desde los islotes pancreáticos, bien por un efecto directo sobre las células beta o por un efecto indirecto a través de la somatostatina (Tanizawa y cols. 1997).

La influencia de estas hormonas en el proceso reproductivo ha cobrado interés en los últimos años a raíz de los nuevos datos sobre la función endocrina de la grasa (Comninos, Jayasena y Dhillon 2013). Así, los distintos estímulos endocrinos, autocrinos, paracrinos y yuxtracrinos que deben de coordinarse para el desarrollo correcto de la gestación, pueden verse alterados si existe obesidad, RI y/o niveles anormales de leptina y todo ello podría influir en los resultados del proceso de FIV, tal como se esquematiza en la figura 11.

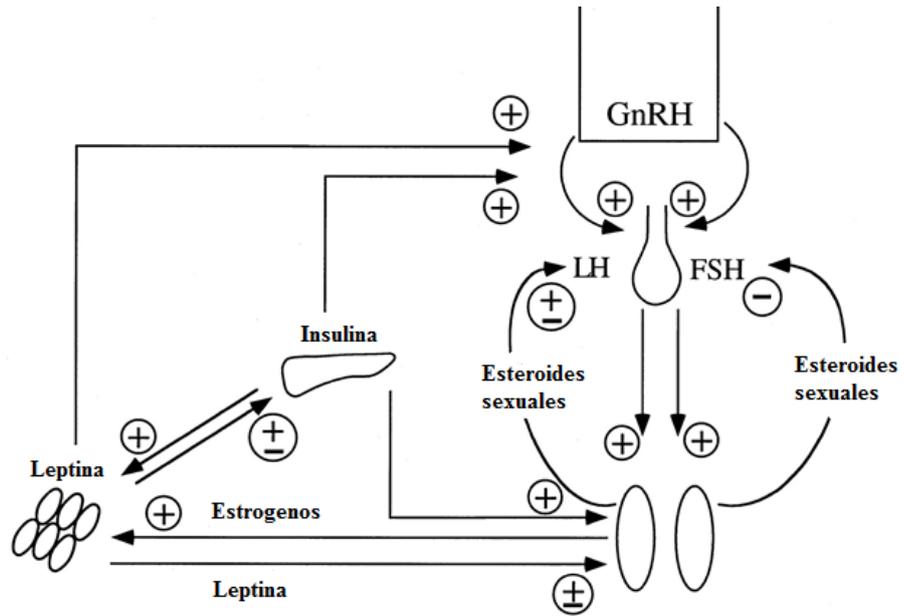


Figura 11.- Esquema de la interacción de las distintas hormonas en el eje neuroendocrino gonadal.

Modificada de: Poretsky y cols. 1999a

II. **HIPÓTESIS:**

Se plantea probar la hipótesis de que la resistencia a la insulina ocasionada por la obesidad abdominal estimularía la producción de leptina intrafolicular durante la estimulación ovárica controlada, lo que determinará peores resultado en los ciclos de fecundación “in vitro”.

III. OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

III.1. OBJETIVO PRINCIPAL:

Estudiar la relación entre los valores de HOMA-IR y los valores intrafoliculares de leptina, valorando su influencia en los resultados de los ciclos de FIV/ICSI en pacientes con y sin obesidad abdominal.

III.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- 1) Estudiar si en nuestra muestra la obesidad general o abdominal y/o la resistencia a la insulina se relacionan con la probabilidad de gestación en los ciclos de FIV/ICSI.
- 2) Estudiar si el tipo de protocolo empleado o los niveles de E₂ alcanzados al final de la EOC se relacionan con los niveles intrafoliculares de leptina.
- 3) Explorar la posibilidad del uso de los valores de HOMA-IR y de leptina intrafolicular como predictores diagnósticos del éxito en los ciclos de FIV/ICSI.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

IV.1. Tipo de estudio:

Se diseñó un estudio observacional de casos y controles, longitudinal, abierto, prospectivo y unicéntrico.

IV.2 Cálculo del tamaño de la muestra:

Se realizó un cálculo del tamaño mínimo de la muestra mediante el paquete informático ENE 2.0, a partir de unos valores medios de leptina intrafolicular estimados de 16.4 ng/ml con una desviación típica en torno a ± 2 ng/ml (Mantzoros y cols. 2000), de forma que un tamaño muestral de 54 pacientes en cada brazo aporta una potencia del 99% para detectar diferencias de media desviación típica, teniendo en cuenta una significación del 5%.

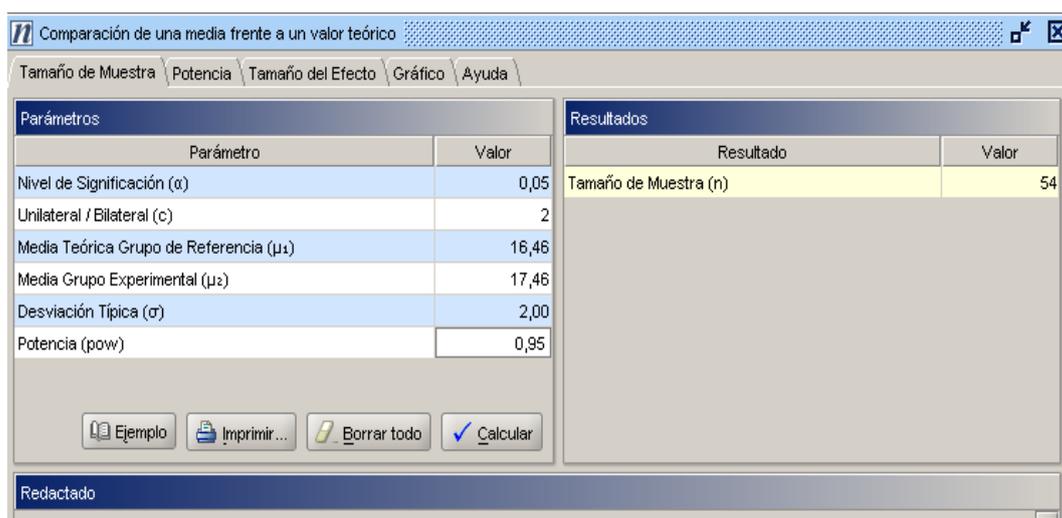


Figura 12.- Captura de pantalla del el paquete informático ENE 2.0 en el que se muestra el tamaño de la muestra comparando una media frente a un valor teórico.

IV.3. Sujetos del estudio

Para la realización de este trabajo se reclutaron 140 pacientes que acudieron a la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), entre septiembre de 2011 y Junio de 2013, solicitando la realización de una TRA mediante la técnica de FIV/ICSI por problemas de esterilidad y que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

- Diagnóstico de esterilidad primaria.
- Trastorno de la fertilidad que precisase de TRA mediante FIV/ICSI.
- Conformidad para participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado, además del consentimiento informado propio de la técnica de FIV/ICSI.
- Edad entre 21 y 40 años.
- Cariotipo normal de la pareja.
- Cumplir el protocolo médico vigente para ser incluida en el programa de la Unidad FIV del HUCA con normalidad de la exploración física, ginecológica, hemograma, pruebas de coagulación, bioquímica sanguínea, así como negatividad de las pruebas serológicas (VDRL, Hepatitis B y C, HIV) en ambos miembros de la pareja, test de reserva ovárica y parámetros seminales aptos para realizar FIV/ICSI.

Criterios de exclusión

- Diagnóstico de SOP.
- Presencia de enfermedad oncológica.

- Presencia de diabetes mellitus y/o enfermedad tiroidea.
- Presencia de patología ginecológica orgánica que contraindicase la realización de FIV/ICSI.
- Más de tres ciclos de EOC.

IV. 4. Valoración clínica de las pacientes

Todas las participantes fueron evaluadas mediante la cumplimentación de una historia clínica, una exploración física y ginecológica, así como la realización de una ecografía transvaginal antes de ser incluidas en el programa de EOC.

Dentro de la exploración física se realizó una determinación del peso en una balanza digital y de la talla mediante un estadiómetro con la paciente en bipedestación, vestida con un camisón ligero y sin zapatos. El peso se registró en kilogramos y la altura en centímetros, calculándose el IMC según la fórmula de peso en Kg dividido por el cuadrado de la altura en metros cuadrados, categorizándose a las pacientes como: bajo peso si es menor de $18,5 \text{ Kg/m}^2$, peso normal entre $18,5$ y $24,9 \text{ Kg/m}^2$, sobrepeso entre 25 y $29,9 \text{ Kg/m}^2$ y obesidad si es igual o mayor de 30 Kg/m^2 . La circunferencia abdominal se midió con una cinta antropométrica colocada directamente sobre el punto más estrecho entre el reborde de la última costilla y la cresta iliaca, en un plano perpendicular al eje longitudinal del cuerpo, con la mujer en bipedestación y ambos brazos colgado libremente y separados unos 20 cm a lo largo del cuerpo, considerándose que existía obesidad abdominal cuando la circunferencia era igual o mayor de 80 cm.

IV.5. Protocolo de estudio clínico y analítico

Todas las mujeres disponían de un estudio previo de esterilidad, incluida su pareja, realizado en la consulta de esterilidad del HUCA o en alguno de los servicios de ginecología de los Hospitales de la Comunidad Autónoma de Asturias que emplean a la Unidad de FIV como centro de referencia. En dicho estudio se constataba la causa de esterilidad y el motivo por el que se precisaba una TRA mediante FIV-ICSI, así como una exploración física general y ginecológica, una ecografía transvaginal con recuento de folículos antrales, un perfil hormonal en la primera fase del ciclo con FSH, LH, estradiol, TSH y Prolactina.

Tras la realización de las medidas antropométricas, las pacientes fueron evaluadas por un ginecólogo de la Unidad de FIV que realizaba una exploración clínica y ginecológica, un test de transferencia y una ecografía transvaginal evaluando la forma y el tamaño del útero, la cavidad endometrial, el volumen ovárico y el recuento de folículos antrales considerándose como tales aquellos comprendidos entre 2 y 10 cm.

Antes de iniciar el ciclo de EOC y aprovechando la venopunción para la realización de las serologías de HIV, sífilis y hepatitis, se obtuvo una muestra de sangre entre las 9 y las 10 a.m. tras una noche de ayuno para su procesamiento en el laboratorio de bioquímica del HUCA, por personal sanitario “ciego” a los datos de la investigación. En dicha muestra se determinaban: glucosa por un método enzimático con hexoquinasa, perfil lipídico por método Trinder, e insulina y estradiol por electroquimioluminiscencia. Además, con otra muestra de sangre obtenida en la misma

venopunción se realizó una alícuota para su almacenamiento a -80°C por si fuese necesario realizar ulteriores estudios.

Los valores de normalidad de glucosa en suero para el laboratorio eran los comprendidos entre 70 y 105 mg/dL, los de insulina en suero eran los comprendidos entre 2,6 y 24,9 $\mu\text{U/mL}$ y un valor de HOMA-IR mayor de 2,5 era considerada como indicativa de RI (Matthews y cols. 1985).

IV.6. Protocolos de estimulación ovárica empleados y monitorización

El inicio de la estimulación ovárica fue programado mediante el uso de anticonceptivos orales durante un periodo inferior a 20 días. El tipo de protocolo de EOC y las dosis de gonadotrofinas utilizadas se eligieron de acuerdo con las características de la mujer, considerando marcadores de reserva ovárica como: la edad, el IMC, niveles séricos de FSH y E_2 en el 2-3 día del ciclo, el recuento de folículos antrales, la presencia de hábito tabáquico y el tipo de respuesta obtenido a protocolos previos si los hubiese realizado. La mayoría de los ciclos elegidos seguían el esquema corto con antagonistas de la GnRH (CC) y sólo en un pequeño número de casos se emplearon ciclos largos previa desensibilización de la hipófisis con agonistas de GnRH (CL). Las dosis de gonadotrofinas utilizadas oscilaron entre 1500 y 3000 Ui de FSH recombinante o urinaria y entre 75 y 150 Ui de LH recombinante o urinaria.

La monitorización del ciclo se realizó a partir del 6º día de la administración de gonadotrofinas mediante el seguimiento ecográfico y con determinación de los niveles de E_2 y P_4 , procediéndose a la administración de HCG (250 μg de Ovitrelle®) para

desencadenar la ovulación cuando 3 o más folículos alcanzaron los 17 mm y el estradiol fue de más de 800 pg/ml. La punción se programó a las 36 horas de la administración de la HCG.

A lo largo de la EOC se monitorizó el desarrollo folicular, procediéndose al recuento de folículos y su medición mediante un ecógrafo 2D (Thosiba Nemio®) con sonda vaginal de 7,5MHz en los días 7º y 10º del estímulo. El endometrio fue también monitorizado registrándose el espesor endometrial en mm y el aspecto del mismo con arreglo a los tres patrones ecográficos descritos en la literatura (Gonen y cols. 1990).

La punción folicular se realizó en el quirófano con ambiente estéril, bajo sedación anestésica ligera, utilizándose un ecógrafo 2D (Thosiba Nemio®) con sonda vaginal de 7,5MHz a la que se ajustaba una guía de punción desechable por la que se introducía una aguja de 17 G (Cook 17 G®). Antes de realizar la punción se procedió a un lavado vaginal con suero fisiológico y a la evaluación del endometrio y de los ovarios por ecografía con el fin de descartar una posible hiperestimulación ovárica. A continuación, se realizó la medición del primer folículo que se elegía para puncionar en los tres diámetros, tras lo que se procedió a puncionar dicho folículo tomándose una muestra de líquido folicular aspirada suavemente. Seguidamente, se procedía a su inmediato centrifugado para la obtención de una alícuota que se almacenó a -80°C hasta la determinación de leptina en el laboratorio de Fisiología de la Universidad de Oviedo por el doctorando y un segundo investigador que auditaba el primer resultado, permaneciendo ambos ciegos a los resultados de la EOC. Para la medición de la leptina intrafolicular se utilizaron Kits de Elisa (EZHL-80SK, Linco, Billerica, MA, USA).

Durante la punción se registraron los siguientes parámetros: el tamaño del primer folículo puncionado, el número de folículos que fueron puncionados en cada ovario, el número de oocitos obtenidos, la duración de la punción y la existencia o no de posibles incidencias. El líquido folicular obtenido en la punción del primer folículo era separado por el investigador, siguiendo el procedimiento señalado anteriormente, mientras que el resto de material obtenido en la punción se trasladaba al equipo de biólogos de la Unidad de Reproducción Asistida para su evaluación y manejo con arreglo a la técnica de FIV/ICSI habitual.

Con arreglo al protocolo habitual de FIV/ICSI en el laboratorio de la Unidad de FIV del HUCA, se procedió a la introducción de un espermatozoide en el ovocito metafase II a las 4 horas de la punción realizándose la valoración de la calidad embrionaria por medio de parámetros morfocinéticos según la clasificación de ASEBIR en 4 categorías: A, B, C y D.

Los embriones fueron transferidos bajo visión ecográfica 2 ó 3 días después y, según el número de embriones viables y el deseo de la paciente, se transfirieron 1, 2 ó 3 embriones, aconsejándose realizar un test de gestación 14 días después de la transferencia embrionaria para confirmar el embarazo. Cuando éste fue positivo, se realizó una ecografía en la 6ª semana de gestación. El control posterior de la gestación y la asistencia al parto se realizó en área sanitaria a la que pertenecía la paciente, la cual remitía posteriormente y por correo el informe de los resultados del parto completando un cuestionario diseñado por la Unidad de Reproducción. En aquellos casos en que la paciente no remitía dicho informe, el investigador contactó telefónicamente con ella para conocer la evolución final de la gestación, solicitándole que remitiese por correo el

cuestionario entregado. Los resultados del embarazo eran clasificados como: nacido vivo (recién nacido vivo después de la semana 24 de gestación), gestación evolutiva (ecografía con presencia de feto vivo intraútero en la semana 6-7 de gestación), gestación clínica (presencia de saco gestacional intraútero), gestación bioquímica (presencia de test hCG positivo combinado con ausencia de hallazgos ecográficos de gestación), aborto (pérdida fetal antes de la semana 20 de gestación) y gestación ectópica (presencia de embarazo que implanta fuera del útero)

IV.7. Variables incluidas en el estudio

Se realizó un registro de datos en un cuaderno electrónico de recogida de datos mediante una hoja Excel, con las siguientes variables: edad de las pacientes y de su pareja, años de esterilidad, causa de esterilidad, peso, talla, IMC, circunferencia abdominal, patología ginecológica si la hubiera, morfología y grosor endometrial, tamaño del ovario, recuento de folículos antrales, FSH y E₂ en el 2°-3° día del ciclo, glucemia, insulina y perfil lipídico, tipo de ciclo de EOC utilizado (CC, CL), tipo y dosis total de gonadotrofinas empleadas durante la estimulación, número de folículos en desarrollo y tamaño de los mismos, morfología y espesor endometrial en mm, valores de E₂ y de P₄ en el último control de la EOC antes de la punción folicular, tamaño del primer folículo (valor medio de los diámetros en mm), número total de folículos puncionados, valor de leptina intrafolicular, número de oocitos obtenidos, número de oocitos maduros, número de oocitos fecundados, número de embriones obtenidos, calidad de los embriones, número de embriones transferidos, positividad o no de beta-HCG con un resultado >10 IU/L, existencia de embarazo ectópico y/o abortos,

positividad de embarazos intrauterinos por ecográficos con visualización o no de latido cardíaco fetal.

IV.8. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete informático SPSS software package (Version 13.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) a partir de una hoja de recogida de datos en Microsoft Office Excel 2007.

Se realizó una estadística general básica destinada a perfilar la muestra de las participantes mediante un análisis descriptivo de las variables. Las variables cuantitativas se describen como medias y desviación estándar. Antes de hacer cualquier comparación se comprobó la distribución o no con arreglo a la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Aquellas variables con distribución normal se compararon entre sí con el T-test de Student, tras comprobar la homogeneidad de las varianzas, en caso de dos grupos independientes. En el caso de más de dos grupos independientes se utilizó el test de ANOVA. Aquellas variables que no se distribuían con arreglo a la normalidad se compararon entre sí mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney para dos muestras independientes. Las variables cualitativas se compararon mediante el test de Chi-cuadrado. La correlación entre variables se estudió mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson.

Se realizó también un estudio multivariable con regresión logística binaria y una evaluación de sensibilidad y especificidad mediante Receiver Operating Characteristic (ROC). Se empleó un modelo lineal mediante regresión logística mediante el método Forward:LR y se realizó un cálculo del índice de Youden para conocer el punto de corte óptimo de sensibilidad y especificidad diagnóstica. En todo el estudio matemático se consideró el grado de significación estadística en una probabilidad menor de 0,05.

IV.9. Consideraciones Éticas

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias al considerar que cumplía con todos los requisitos legales y éticos para ser llevado a cabo.

V. RESULTADOS

V.1. Descripción y análisis exploratorios de la muestra

Entre octubre de 2011 y marzo de 2013 fueron reclutadas 140 pacientes que firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio. Las causas de esterilidad, el protocolo de EOC empleado y las tasas de embarazo se muestran en la tabla II.

Causa esterilidad	n =140	%
Factor masculino	55	39,3
Causas mixtas	38	27,1
ESCA	28	20%
Factor femenino	11	7,80%
Causas mixtas	8	5,7
Protocolo*	n=138	%
Antagonista GnRH	119,00	86,2
Agonista GnRH	19,00	13,8
Embarazo	n=130**	%
	30	23,1

*Dos casos (1.4%) no iniciaron EOC por cancelación previa

**Porcentaje por transferencia. (Porcentaje por ciclo iniciado [n=138] 21,7%)

Tabla II.- Distribución de la muestra según las causas de esterilidad, el protocolo de EOC empleado y los resultados obtenidos. ESCA= esterilidad sin causa aparente.

La clasificación de las 140 pacientes que iniciaron el estudio según sus características antropométricas se muestra en la figura 13. Cuando se consideraba el IMC, 88 pacientes (62,9%) se encontraban en normopeso, 37 pacientes (26,4%) se encontraban en sobrepeso y 15 pacientes (10,7%) eran obesas. Cuando se consideraba la CA, 56 pacientes (40%) tenía una CA ≥ 80 cm y en 84 pacientes (60%) no se observó obesidad abdominal.

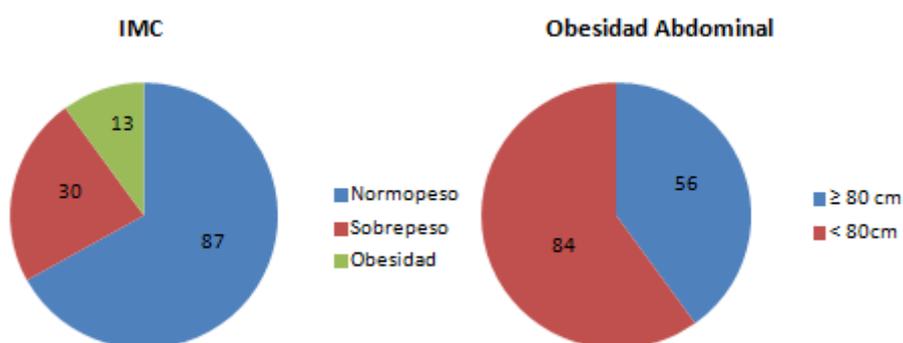


Figura 13.- Distribución de las 140 pacientes que iniciaron el estudio con arreglo a las características antropométricas.

De las 140 pacientes, 10 (7,1%) no pudieron completar el ciclo de FIV, bien por no llegar a iniciar la EOC en 2 casos (1,4%), por cancelación del EOC debido a baja respuesta en 5 casos (3,6%) y por cancelación del EOC por respuesta excesiva en 3 casos (2,2%).

Entre las 138 pacientes que realizaron análisis de sangre para la determinación de glucosa e insulina, treinta y dos pacientes (23,1%) fueron diagnosticadas de RI al mostrar un valor de HOMA-IR $\geq 2,5$.

Las características antropométricas y analíticas de las 130 pacientes que llegaron a punción folicular y transferencia embrionaria, así como las causas de esterilidad, los protocolos empleados y la tasa de embarazos por ciclo iniciado se muestran en la tabla III.

	Media	Desviación estándar	Rango
Edad	34,8	3,01	26,0 - 40,0
Peso (Kg)	63,4	11,18	47,0 - 108,0
IMC	24	3,92	18,3 - 40,6
CA (cm)	78,9	9,06	62,0 - 112,0
Insulina mU/l	9,3	4,41	3,0 - 29,8
HOMAIR	2	1	0,6 - 6,5
QUICKI	0,4	0,02	0,3 - 0,4
Colesterol mg/dl	203,1	37,11	133,0 - 360,0
HDL mg/dl	69,6	18,25	37,0 - 151,0
LDL	115,9	35,3	52,0 - 284,0
Triglicéridos mg/dl	90,1	54,06	26,0 - 416,0
E ₂ pg/ml	1815,2	1095,38	23,3 - 6411,0
P ₄ ng/ml	0,8	0,38	0,1 - 2,0
Leptina ng/ml	15,9	6,28	3,4 - 36,3
Nº de Foliculos	11,6	4,89	3,0 - 23,0
Tamaño Fol (cm)	21,1	4,32	3,0 - 36,0
O. recuperados	9,8	5,15	1,0 - 25,0
O. maduros	7,9	4,3	0,0 - 19,0
O. fertilizados	4,9	2,94	0,0 - 14,0
Nº Embriones A	0,9	1,09	0,0 - 5,0
Nº embr transf.	1,4	0,69	0,0 - 3,0

Tabla III. - Características generales de las 130 pacientes incluidas en el estudio que completaron el ciclo de EOC con transferencia embrionaria.

E₂= estradiol, P₄= Progesterona, O.= Oocitos

La evolución de los embarazos obtenidos en las 130 pacientes a las que se practicó transferencia embrionaria se muestra en la figura 14. Veintidós casos (73,3%) evolucionan como una gestación normal, 5 casos (16,6%) finalizaron como aborto antes de la semana 15, 1 caso (3,3%) evolucionó como una gestación gemelar, 1 caso (3,3%) cursó como una gestación bioquímica sin llegar a observarse vesícula intraútero y 1 caso (3,3%) cursó como una gestación ectópica bilateral.

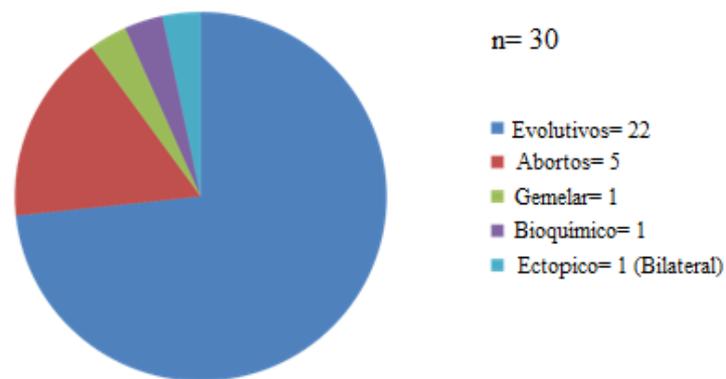


Figura 14. - Evolución de los 30 embarazos obtenidos en las 130 pacientes a las que se realizó transferencia embrionaria.

V.2. Análisis univariantes y bivariantes para subgrupos

La presencia de RI era significativamente más elevada en las pacientes obesas respecto a las normales (28,1% vs 3,7%; $p < 0,001$) y en las pacientes con $CA \geq 80$ cm respecto a las pacientes sin obesidad abdominal (81.3% vs 18.8%; $p < 0,001$).

La calidad seminal no difería de forma significativa entre los diferentes grupos antropométricos en que se distribuyeron las mujeres y tampoco había diferencias significativas en cuanto al protocolo de EOC empleado (tablas IV y V).

IMC	Semen Normal %	Semen Patológico %
Normopeso	30,9	69,1
Sobrepeso	45,9	54,1
Obesidad	25	75
CA		
< 80 cm	29,1	70,9
≥ 80 cm	43,1	56,9

Tabla IV.- Calidad del semen aportado por la pareja, a las mujeres ordenadas según sus valores antropométricos.

Protocolo EOC		Antagonista GnRH %	Agonista GnRh %
IMC	Normopeso	90,6	9,4
	Sobrepeso	66,7	33,3
	Obesidad	100	0
CA	< 80 cm	91,6	8,4
	≥ 80 cm	74,5	25,5

Tabla V.- Comparación de las pacientes según el protocolo de EOC empleado y las características antropométricas de las mujeres sometidas a estímulo.

Las dosis medias de FSH utilizadas durante la EOC fue de 2278 ± 720 Ui en las pacientes normales, 2463 ± 668 Ui en las pacientes con sobrepeso y 2601 ± 786 Ui en las pacientes obesas, observándose una tendencia al aumento de las dosis a medida que aumenta el IMC, pero sin que existiesen diferencias estadísticamente significativas, tal como se muestra en la figura 15.

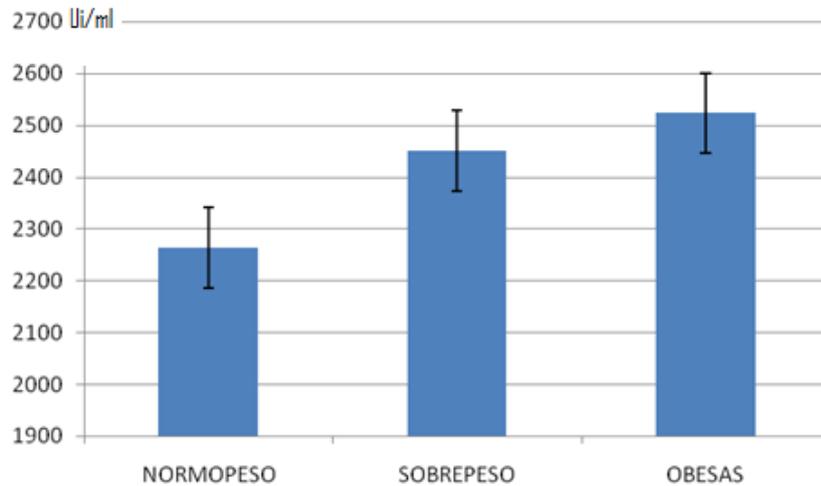


Figura 15.- Dosis media de FSH empleadas durante la EOC en las pacientes sometidas a estímulo, clasificadas según IMC.

En las pacientes que presentaban una CA \geq 80 cm la dosis media de FSH fue de 2264 \pm 670 Ui y en las que presentaban una CA < 80 cm la dosis media de FSH fue de 2509 \pm 766, sin observarse tampoco diferencias estadísticamente significativas entre ellas, tal como se muestra en la figura 16.

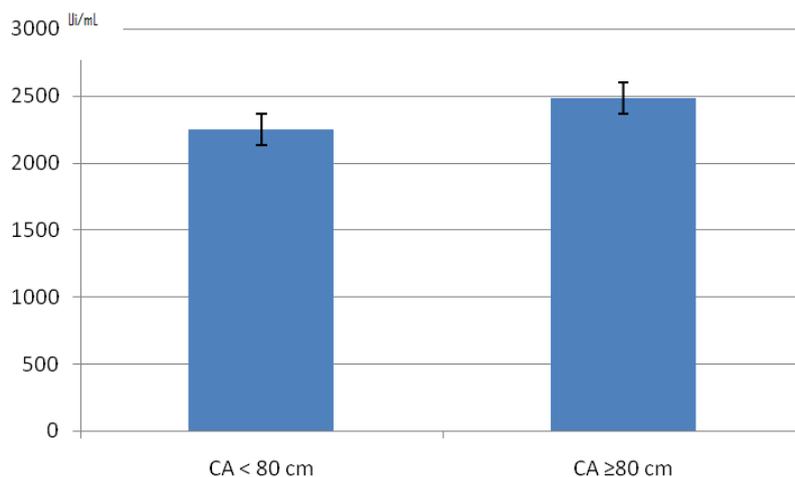


Figura 16.- Dosis media de FSH empleada durante la EOC en las pacientes sometidas a estímulo, clasificadas según tuviesen o no obesidad abdominal.

Los niveles intrafoliculares de leptina no se correlacionaban con las dosis de FSH ($R = 0,018$) o con las dosis de LH ($R = 0,013$). Tampoco existían diferencias estadísticamente significativas entre las dosis media de leptina alcanzadas al final de la EOC cuando se empleaba un protocolo con antagonistas de GnRH $15,6 \pm 5,8$ ng/mL o cuando se empleaba un protocolo largo con agonistas de la GnRH $17,8 \pm 8,5$ ng/mL, tal como se muestra en la figura 17.

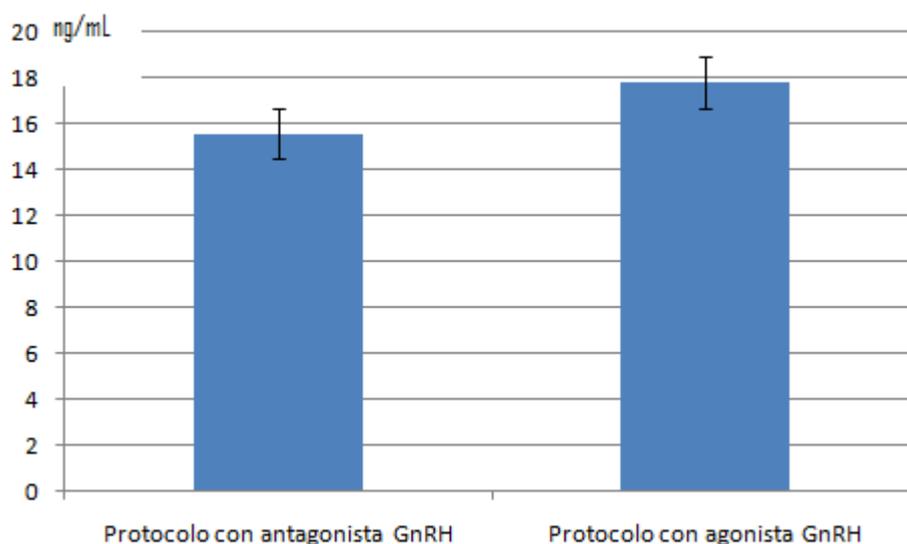


Figura 17.- Valores medios de leptina intrafolicular según el protocolo EOC utilizado en las pacientes sometidas a estímulo que llegaron a punción folicular.

La posibilidad de cancelación del ciclo, los niveles séricos de E₂ y de P₄ en el último control de EOC antes de la punción, el número de oocitos recuperados, el número de oocitos maduros, el número de embriones tipo A y la tasa de embarazos no dependía de si las pacientes eran obesas o no, o de si presentaban CA \geq 80 cm o normal. Únicamente se observó que el número de oocitos fertilizados era menor en el grupo de mujeres con obesidad abdominal respecto a las mujeres que tenían una CA normal (Tablas VI y VII).

	<u>Obesas</u>	<u>Normales</u>
E2 pg/mL	1390,2±477,6	1834,7±1042,1
P4 ng/mL	0,7±0,4	0,8±0,4
Foliculos	12,5±4,7	11,4±4,9
O. Recuperados	9,8±4,9	9,7±5,1
O. Metafase II	8,7±4,7	7,8±4,2
O. Fertilizados	5±2,5	4,9±2,9
Embriones A	0,9±0,9	0,8±1,1
T. cancelación	15,4%	6,7%
T. embarazo evol	0%	22,10%

Tabla VI.- *Diferencias en los valores medios entre mujeres obesas y normales entre las pacientes que llegaron a transferencia embrionaria. O= oocitos, T.= tasa, evol= evolutivo.*

	<u>CA ≥ 80 cm</u>	<u>CA < 80 cm</u>
E2 pg/mL	1722,2±998,9	1845,7±1025,6
P4 ng/mL	0,7±0,3	0,9±0,4
Foliculos	11,5±5,2	11,5±4,6
O. Recuperados	9,4±5,2	10±5,1
O. Metafase II	7,6±4,7	8,1±4,1
O. Fertilizados	4,2±2,7	5,3±3,0 *
Embriones A	0,7±0,9	0,9±1,1
T. cancelación	6,0%	8,9%
T. embarazo evol	14,3%	17,9%

Tabla VII.- *Diferencias en los valores medios entre mujeres con obesidad abdominal y normales entre las pacientes que llegaron a transferencia embrionaria. O= oocitos, T.= tasa, evol= evolutivo. *(p=0,035).*

La posibilidad de gestación con nacido vivo según el IMC distribuido en terciles no mostró diferencias estadísticamente significativas, tal como se muestra en la figura 18. Tampoco se apreció una peor tasa de implantación en las pacientes obesas.

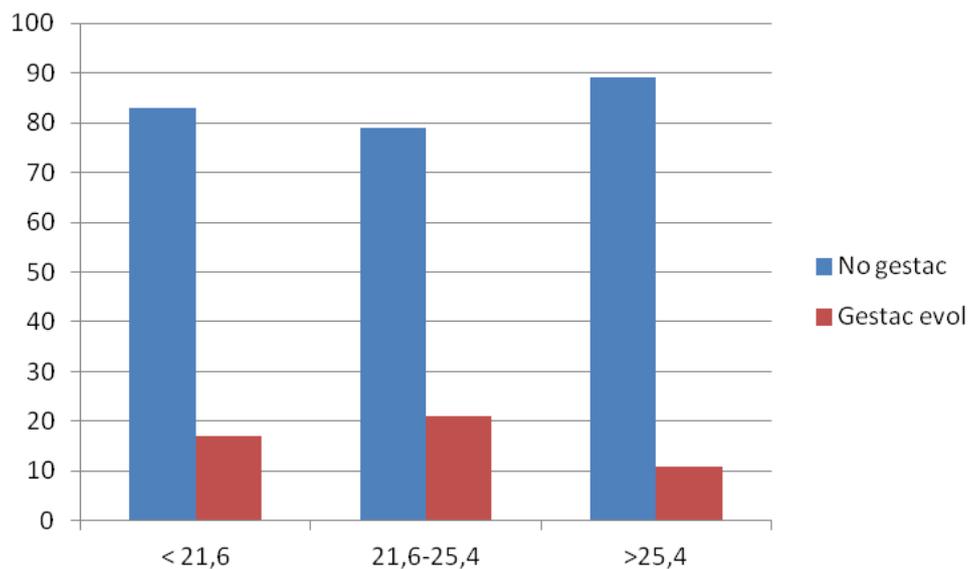


Figura 18.- Porcentaje de mujeres que logran gestación nacido vivo y que no la logran distribuidas según IMC distribuido en terciles.

Cuando se consideraron las pacientes con RI respecto a las normales se observó que no existían diferencias en cuanto al tipo de protocolo de EOC empleado entre las pacientes con RI respecto a las pacientes normales (protocolo corto con antagonistas de GnRH en 84,3% vs protocolo largo con agonistas de GnRH 81,3%, $p= ns$) ni en las dosis medias de FSH empleadas (Ui en pacientes con RI 2430 ± 763 Ui vs 2339 ± 705 Ui en pacientes normales; $p= ns$).

Las pacientes con RI no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de estradiol, progesterona o espesor endometrial registrados en el último control antes de la administración de HCG. En ellas se obtenía un valor medio menor de oocitos, pero tampoco había diferencias estadísticamente significativas en el número medio de oocitos maduros, en el número medio de oocitos fertilizados, o en la tasa de cancelaciones o de gestaciones con nacido vivo, tal como se muestra en la tabla VIII.

	<u>RI</u>	<u>Normales</u>
E2 pg/mL	1503,2±646,9	1911,7±1186,7
P4 ng/mL	0,7±0,3	0,8±0,3
Foliculos	10,6±5,2	11,±4,6
O. Recuperados	8,0±5,1	10,3±5,1 *
O. Metafase II	6,7±4,8	8,3±4,1
O. Fertilizados	4,0±2,9	5,2±2,9
Embriones A	0,6±0,9	0,9±1,1
T. cancelación	6,3%	7,4%
T. embarazo evol	9,4%	18,5%

Tabla VIII.- *Diferencias en los valores medios entre mujeres con Resistencia a la insulina y normales entre las pacientes que llegaron a transferencia embrionaria. O= oocitos, T.= tasa, evol= evolutivo *(p=0,035).*

Los valores de HOMA-IR se correlacionaron también de forma negativa (*Correlación de Pearson -0,237; p=0,007*) con el número de oocitos fertilizados, tal como se muestra en la figura 19.

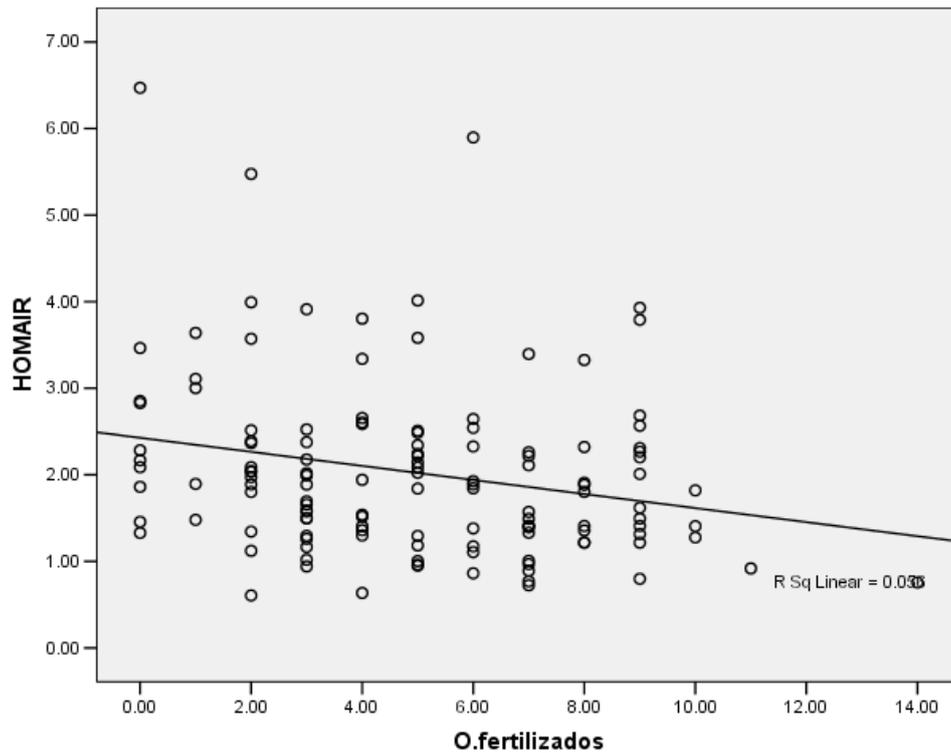


Figura 19.- Correlación entre HOMA-IR y número de oocitos fertilizados.

De las cuatro pacientes en las que se constató un síndrome metabólico, una de ellas consiguió embarazo bioquímico sin que se pudiese observar saco gestacional intraútero en el primer control ecográfico, de manera que ninguna paciente con síndrome metabólico tuvo una gestación nacido vivo.

Los valores de medios de leptina intrafolicular resultaron ser significativamente más elevados en las pacientes con $IMC > 30$, $CA \geq 80$ cm y $HOMA-IR \geq 2,5$, respecto a las pacientes que no estaban obesas o no presentaba IR, tal como se muestra en la figura 20.

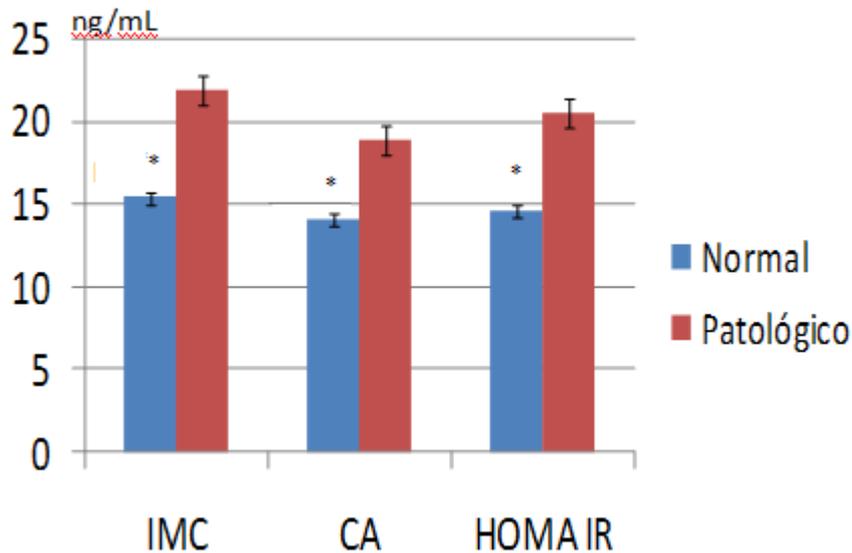
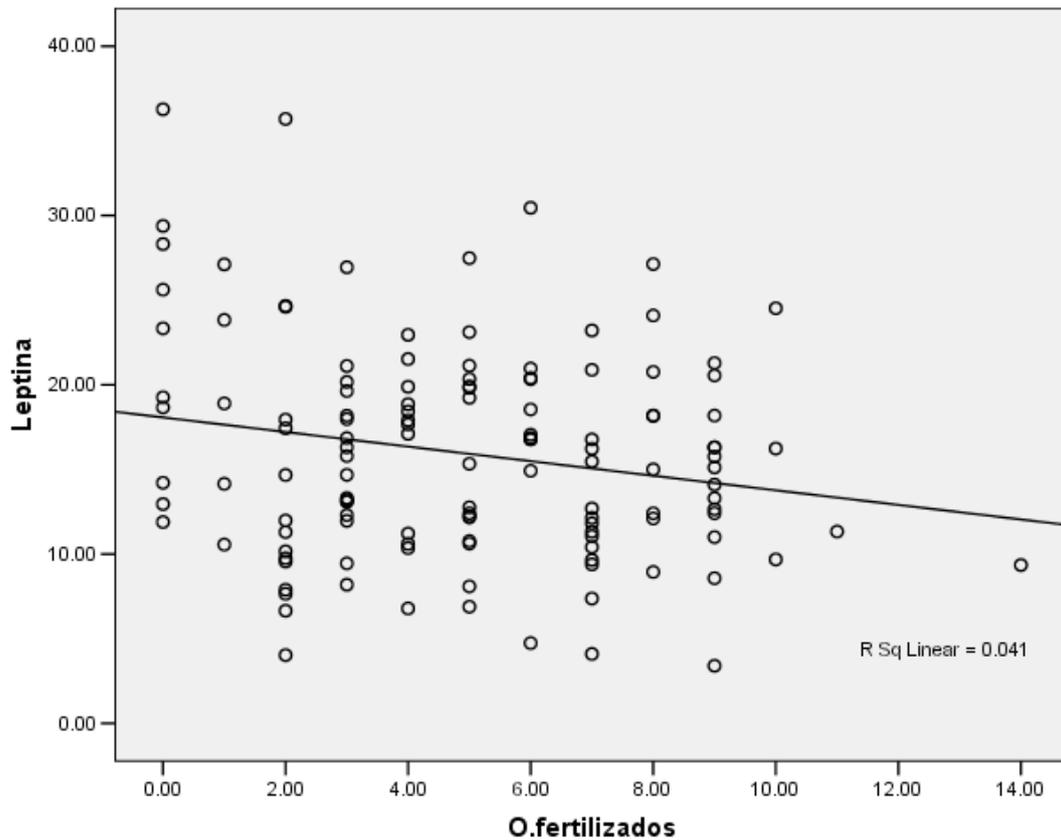


Figura 20.- Valores de leptina intrafolicular en función del IMC, la CA y el HOMA-IR en las pacientes que llegaron a punción folicular. Se consideran Patológico: $IMC \geq 30$, $CA \geq 80cm$ y $HOMA-IR > 2,5$. $*(p < 0,001)$.

El estudio de comparación de medias mostraba que los valores medios de leptina intrafolicular no se correlacionaron con la edad, la dosis de FSH empleada, los niveles séricos de estradiol, progesterona, el espesor endometrial registrados en el último control de la EOC antes de la punción, el número de oocitos, el tamaño del folículo, los oocitos recuperados, los oocitos maduros, ni la posibilidad de cancelación del ciclo. Sin embargo, sí se correlacionaban de forma negativa (*Correlación de Pearson = 0,237*, $p=0,007$), los niveles de leptina intrafolicular con el número de oocitos fertilizados, tal como se muestra en la figura 21.



. **Figura 21.**- *Correlación entre los valores de leptina intrafolicular y el número de oocitos fertilizados.*

Además, cuando se estudió la correlación estadística bivariable de los valores intrafoliculares de leptina, se observó que se correlacionaba de forma positiva con el IMC (Pearson Correlation =0,541; $p < 0,001$), con la CA (Pearson Correlation =0,511; $p < 0,001$) y con los valores de HOMA-IR (Pearson Correlation = 0,359; $p < 0,001$), tal como se muestra en la figura 22.

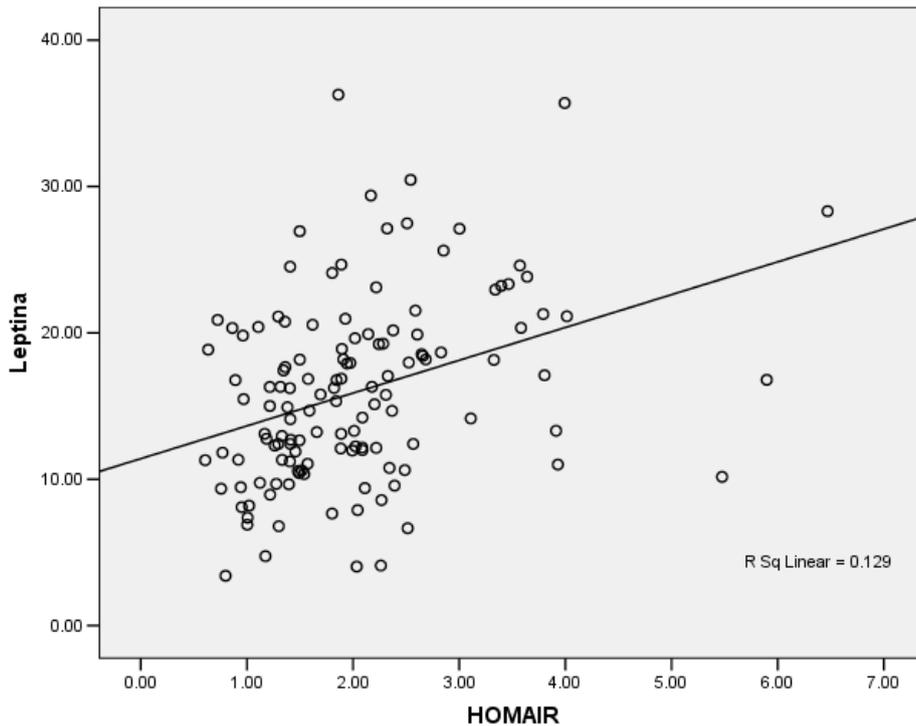


Figura 22. .- Correlación entre los niveles intrafoliculares de leptina folicular y HOMA-IR.

Las pacientes que consiguieron tener un test de embarazo positivo presentaban valores medios de leptina más bajos que las que no se embarazaron (12,4 ng/mL vs 16,9 ng/mL; $p < 0,001$). Esta diferencia, significativas desde el punto de vista estadístico, persistía después de ajustar para las variables edad ($p = 0,001$) e IMC ($p = 0,001$), que son las dos variables que suele aceptarse que influyen más en el éxito de la FIV, o para la CA ($p = 0,001$).

Cuando se comparaban las gestaciones nacido vivo con las no evolutivas (aquellas que finalizaron como gestación bioquímica, aborto o embarazo ectópico), también se observaron valores de leptina intrafolicular estadísticamente más bajos en las gestaciones nacido vivo que en las no evolutivas (11,4 ng/mL vs 16,8 ng/mL; $p < 0,001$),

persistiendo también las diferencias tras ajustar por edad ($p= 0,013$), IMC ($p =0,009$) o circunferencia abdominal ($p=0,001$), como se puede apreciar en figuras 23 y 24.

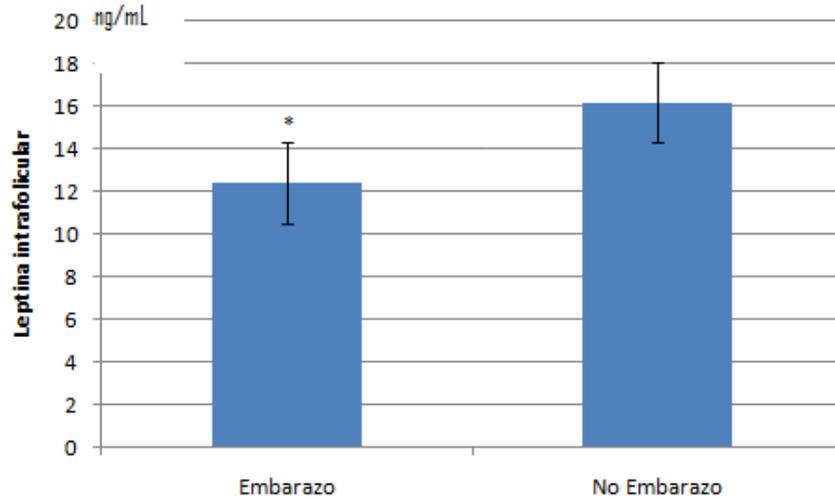


Figura 23.- Valores medios de leptina intrafolicular en las pacientes que se quedaron gestantes y en las que no. $*(p<0,001)$.

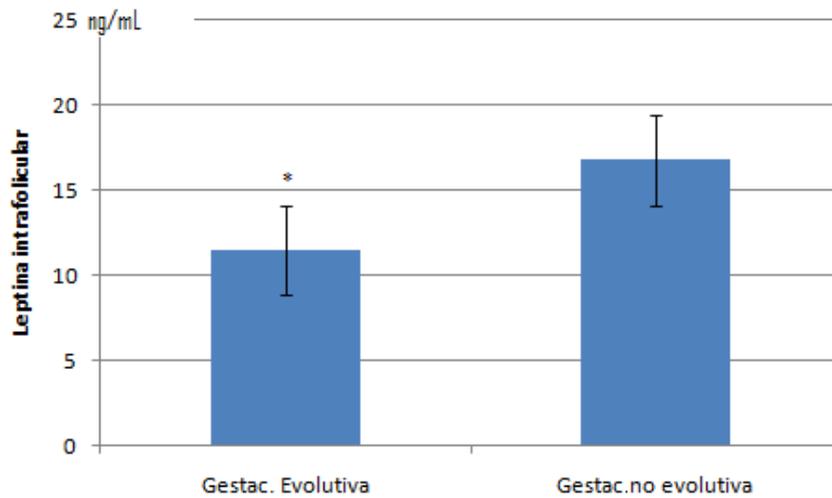


Figura 24.- Valores medios de leptina intrafolicular en las pacientes que tuvieron una gestación nacido vivo y las que no. $*(p<0,001)$.

Los valores de HOMA-IR y los niveles intrafolliculares de leptina no se correlacionaban con los niveles de E_2 ni con el espesor endometrial al final de la EOC.

El análisis ROC para la posibilidad del uso de la leptina intrafolicular como herramienta diagnóstica capaz de distinguir a aquellas pacientes que tienen menos posibilidades de gestación mostró un área bajo la curva de 0,75 (figura 25). Si se elige un valor de corte óptimo de leptina intrafolicular de 12,8 ng/mL correspondiente al valor medio de la muestra más media desviación estandar en las pacientes que tuvieron una gestación con nacido vivo, se obtiene una sensibilidad de la prueba del 69% y una especificidad del 70%. Si este valor de corte se elevase a 16,5 ng/mL disminuiría la sensibilidad al 50%, pero aumentaría la especificidad al 80%.

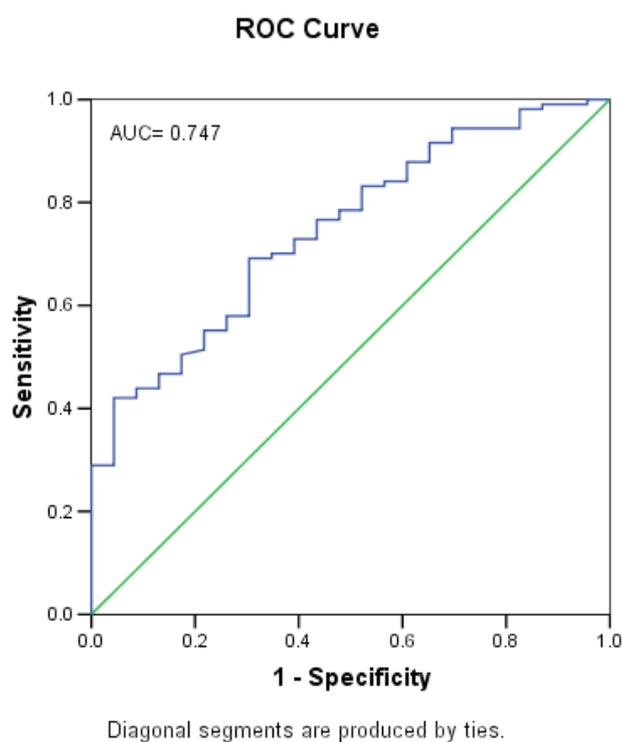


Figura 25.- Curva ROC para la probabilidad de conseguir gestación según los valores de leptina intrafolicular.

La posibilidad de embarazo evolutivo según la distribución de leptina en terciles mostraba diferencias estadísticamente significativas, tal como se muestra en la figura 26.

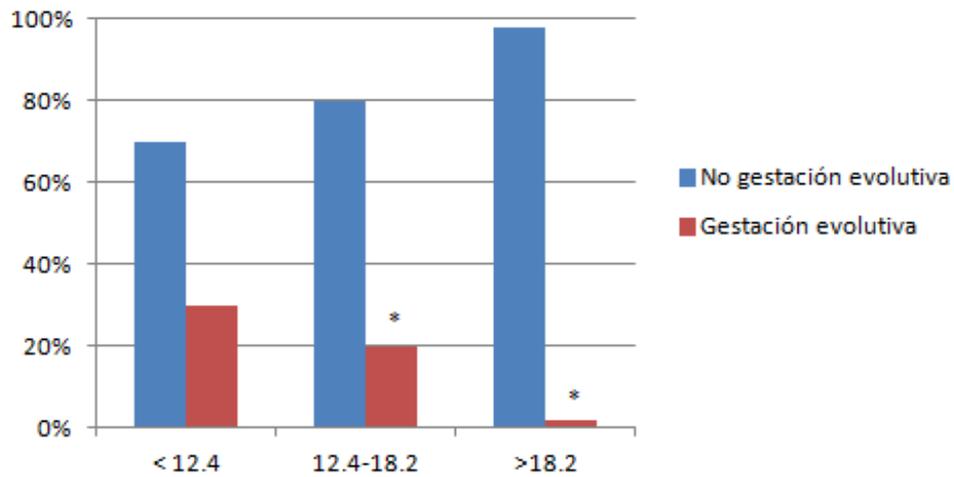


Figura 26.- Porcentaje de mujeres que logran gestación nacido vivo y que no la logran distribuidas según los niveles de leptina intrafolicular distribuidos en terciles. *($p=0,002$).

V.3. Modelos multivariantes análisis ROC y estudios de sensibilidad y especificidad. Desarrollo de un modelo predictivo de posibilidad de embarazo.

El análisis de varianza no encontró ninguna relación entre el IMC o la CA con el número de oocitos recuperados, el número de oocitos maduros, el número de oocitos fertilizados, el número de embriones tipo A o el número de embarazos.

Para el desarrollo de un modelo predictivo de probabilidad de embarazo evolutivo se consideraron, en primer lugar, las características de las pacientes que lograban una gestación nacido vivo y las que no la conseguían, tal como se muestra en la tabla IX.

	Gestación vivo (n = 23; 17,7%)	nacido Gestación no evolutiva (n = 107; 82,31%)
Edad años	35,0 [3,0]	35,5 [14]
Peso (kg)	59,3± 8,8	63,8±10,9
IMC (kg /m ²)	22,8±2,1	24,1±3,8
CA (cm)	74,6±8,1	79,2±8,7 *
Insulina µg/mL	6,4 [5,0]	8,8 [4,0]
HOMA-IR	1,8±1,1	2,1±0,9
E ₂ pg/mL	1466,0 [1311,0]	1475,5 [1031,7]
P ₄ (ng/ml)	0,7 [0,4]	0,8 [0,5]
Leptina (ng/ml)	11,5±4,6	16,8±6,2 **
Nº folículos	13,6±5,4	11,1±4,7 ***
T, folículos (cm)	21,0 [4,0]	21,0 [4,3]
Nº Oocitos	11,1±4,9	9,5±5,2
Oocitos M II	8,5±4,1	7,7±4,3
O. fertilizados	5,7±2,5	4,7±3,0
Emb. Tipo A	1,0 [1,0]	0,0 [1,0]
Nº emb. Transferidos	2,0 [1,0]	1,0 [1,0]

Tabla IX.- Características basales y de tratamiento de las pacientes que fueron sometidas a transferencia embrionaria según lograsen o no gestación con nacido vivo.

Valores medios (\pm DS) o mediana [rango intercuartil]. *($p = 0,02$), **($p < 0,0001$) y ***($p = 0,02$).

La realización de un modelo multivariable mediante regresión binaria logística en la que se consideró como variable predictiva dependiente a la gestación con nacido vivo y como covariables al perímetro abdominal, los valores de HOMA-IR, la edad, el IMC, el perímetro de la cintura en cm, el protocolo de estimulación empleado, la dosis de FSH utilizada en Ui, el HOMA-IR, el número de folículos, los niveles de estradiol y progesterona al final de la EOC y los niveles de leptina intrafolicular mostraba que las tres variables que influían en el resultado eran: el número de folículos, los niveles

séricos de progesterona y los niveles intrafoliculares de leptina, tal como se muestra en la tabla X.

	OR	95.0% C.I. for EXP(B)	
		Lower	Upper
CA (cm)	0,97	0,895	1,047
HOMA-IR	1,18	0,663	2,111
Nº Foliculos	1,22	1,088	1,398 *
E ₂	1,02	0,999	1
P ₄	0,13	0,022	0,825 **
Leptina ng/ml	0,8	0,697	0,936 ***

Tabla X.- Estudio de la influencia de las distintas variables relacionadas con la probabilidad de gestación con nacido vivo tras análisis con regresión logística binaria.

*¹($p = 0,002$), **($p = 0,03$), ***($p = 0,003$).

La evaluación con un modelo lineal mediante el método FORWARD LR por pasos, encontró que 3 variables con significación estadística que podían ser empleadas para predecir la posibilidad de gestación de manera que se aplicó la siguiente fórmula matemática, resultado de multiplicar el valor de Beta por el valor de la variable:

$$-1,904 X Progesterona + 0,177 X Folículos + -0,234 X Leptina$$

Con los valores obtenidos de dicha fórmula, se construyó una nueva variable cuyo análisis ROC dibuja una curva que presenta un buen rendimiento para predecir la posibilidad de gestación con nacido vivo, al tener un área bajo la curva de 0,837, lo que mejora de forma ostensible el rendimiento diagnóstico respecto al uso de la leptina intrafolicular en solitario, tal como se muestra en la figura 27.

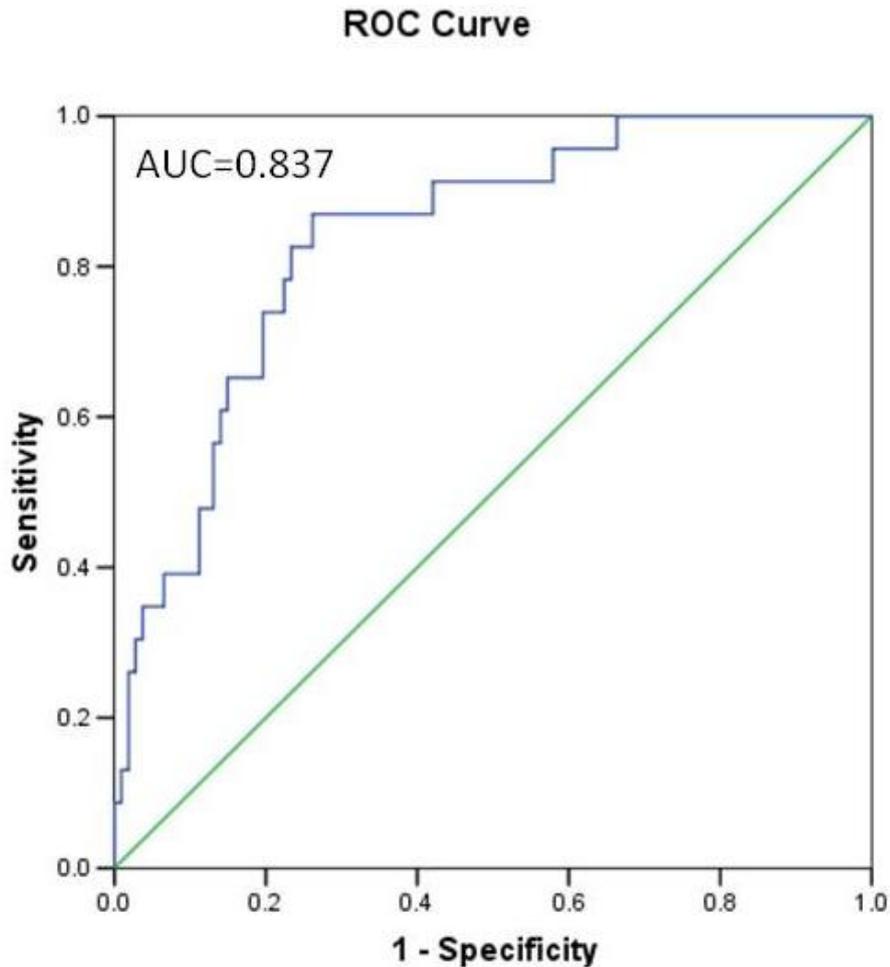


Figura 27.- Curva ROC para la probabilidad de conseguir gestación según el modelo propuesto tras regresión logística binaria con método Forward: LR, considerando el número de folículos, los niveles séricos de progesterona y los niveles intrafoliculares de leptina.

El cálculo del índice de Youden para medir la mejor efectividad diagnóstica de gestación con nacido vivo encuentra que el punto de corte con mejor rendimiento para la ecuación diagnóstica propuesta es de 0,204 con el que se conseguiría una sensibilidad del 78 % y una especificidad del 80%. Otros puntos de corte que podrían ser escogidos según se desee mejorar la sensibilidad o la especificidad, se muestran en la tabla XI.

Valor	Sensibilidad	Especificidad
0,06	96	53
0,204	78	80
0,321	60	97

Tabla XI.- *Diferentes puntos de corte óptimo que pueden ser elegidos con el modelo propuesto para predecir la posibilidad de gestación con nacido vivo*

VI. DISCUSIÓN

La respuesta del organismo al balance energético positivo consiste en almacenar energía, habitualmente en forma de triglicéridos, en el compartimiento subcutáneo y visceral preferentemente. Este almacenamiento excesivo de energía, consecuencia de la sobrealimentación, se asocia a un estado de inflamación crónica, cambios hormonales y disfunción mitocondrial que, junto a otros efectos negativos, originarán anomalías metabólicas que repercuten sobre la salud general del individuo (Lewis, y cols. 2013).

Desde hace muchos años se ha demostrado que un balance de energía equilibrado y un IMC adecuado son esenciales para una capacidad reproductiva correcta (Kennedy y Mitra 1963). Se conoce que la obesidad puede alterar la tasa de fecundidad e incluso modificar los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA), a través de diversos mecanismos que actúan en el sistema reproductivo (de La Croix 2012) y, en concreto, que las alteraciones de la homeostasis de la glucosa junto con las modificaciones en los niveles de leptina juegan un papel importante en la reproducción, que aún no se conoce en profundidad (Yadav, y cols. 2013). La relación entre la insulina, la leptina, las gonadotrofinas pituitarias y la esteroidogénesis ovárica es compleja y probablemente sea diferente en las pacientes con diagnóstico de SOP. En este sentido, el presente trabajo intenta centrarse en la acción gonadal de dichas hormonas en un grupo de pacientes sin diagnóstico de SOP que presentaban o no obesidad abdominal y que eran sometidas a una EOC para realizar una FIV.

La tasa total de embarazos por ciclo iniciado en nuestra muestra resultó menor que la media comunicada por el último registro de la Sociedad Española de Fertilidad para el año 2011 que fue del 28,6%. Esta tasa más baja puede explicarse por el tipo de

centro de reproducción en donde el estudio se llevó a cabo, el cual difiere de otros centros privados que aportan datos al registro general de la Sociedad Española de Fertilidad. Así, si bien es cierto que las pacientes son de edad inferior a 40 años, otros factores claramente relacionados con buenos resultados perinatales como serían la transferencia en fase de blastocistos, el uso de embryoscope, de un programa de donación de oocitos, del diagnóstico genético preimplantacional o un control más exhaustivo del EOC, que no puede llevarse a cabo al no ser posible realizarlo durante los fines de semana por no considerarlo conveniente la administración pública.

A pesar de estos resultados, la tasa de gestaciones con nacido vivo que observamos era de 17,7%, lo que está acorde con los datos de dicho registro que comunican una tasa de gestaciones que finalizan en parto del 16,8% por ciclo iniciado, lo que refleja el buen funcionamiento del laboratorio de reproducción y las menores complicaciones durante la gestación y el parto en las mujeres menores de 40 años respecto a las de mayor edad.

La obesidad en general y la obesidad abdominal en particular, se han relacionado con la necesidad de dosis más elevadas de gonadotrofinas para obtener un número adecuado de oocitos (Bellver y cols. 2010) y con una tasa mayor de pobre respuesta ovárica definida con arreglo a los criterios de Bolonia de la ESHRE como aquella situación en la que se obtienen menos de 4 oocitos en respuesta a una EOC con al menos 150 UI/d de FSH (Ferraretti y cols. 2011). En nuestra muestra, aunque no se ha registrado una diferencia estadísticamente significativa, sí se apreció una tendencia a prescribir dosis más elevadas de gonadotrofinas a medida que aumenta el IMC, pero no

apreciamos diferencias en la tasa de cancelaciones o de pobre respuesta ovárica entre las mujeres obesas y las no obesas.

Algunos investigadores han constatado una peor calidad de oocitos o de los embriones en las pacientes obesas (Metwally y cols. 2007), pero en nuestro estudio no hemos podido apreciar estas diferencias y únicamente se constató un menor número de embriones fertilizados en las pacientes con obesidad abdominal, sin que existiesen diferencias significativas desde el punto de vista estadístico en el número de oocitos o en la proporción de oocitos en metafase II.

En la literatura se muestra una tendencia a la disminución de las tasas de embarazo a medida que aumenta el IMC (Bellver y cols. 2007), especialmente a partir de los 30 años (de Mouzon y cols. 2012) que podría deberse, además de a los peores parámetros ováricos antes referidos, a una receptividad uterina reducida y, por tanto, una peor tasa de implantación (Bellver y cols. 2013). El escaso número de embarazos en pacientes obesas que hemos tenido en nuestra muestra nos impide realizar un análisis estadístico para estudiar si la obesidad se asocia a una peor tasa de embarazo, pero cuando evaluamos la proporción de embarazos con respecto al IMC no apreciamos tampoco diferencias estadísticamente significativas entre los terciles considerados ni una peor tasa de implantación en las mujeres obesas. Tampoco hemos podido constatar peores tasas de embarazo en las mujeres con obesidad abdominal respecto a las mujeres con circunferencia abdominal normal.

Aunque los niveles séricos de insulina no varían a lo largo de la EOC (Genc y cols. 2011), se sabe que la obesidad abdominal se asocia con cambios en citoquinas inflamatorias y con RI que podrían empeorar los resultados perseguidos con dicha

estimulación, independientemente de la pauta de la EOC que se realice y la dosis de gonadotrofinas empleadas. En nuestro estudio, las pacientes que presentaban RI mostraron menos gestaciones con nacido vivo que las pacientes normales, tal como preveíamos; sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa, lo que puede deberse a un error estadístico tipo II (error tipo Beta) dado el escaso tamaño muestral que fue calculado para evaluar diferencias en los niveles de leptina intrafolicular y no para la RI.

Algunos autores han relacionado la RI con niveles más elevados de LH (Brothers y cols. 2010) y con alteraciones de ciclo menstrual (ESHRE Capri Workshop Group 2012). Nosotros no observamos esta relación, si bien debe tenerse en cuenta que en nuestra muestra las mujeres que presentaban SOP fueron excluidas y en ellas es conocido que las cifras de LH tienden a ser más altas y la oligomenorrea es uno de los síntomas principales del síndrome.

En este sentido, resulta interesante considerar también la acción de la insulina sobre las neuronas hipotalámicas, bien de forma directa o a través de su efecto sobre la acción de la GnRH, si bien estas acciones son difíciles de determinar con exactitud, debido a las dificultades para su estudio aislado de otros posibles estímulos hipotalámicos o hipofisarios, como la glucosa o los ácidos grasos que también tienen efectos a esos niveles. Además, aunque existe un grupo de genes de la subfamilia FOXO que se expresa en células gonadotropas y que puede ser modulado por señalización de la insulina (Arriola y cols. 2012) su estudio estaría fuera del ámbito de la presente investigación ya que el propio diseño del estudio impide su evaluación al usarse gonadotrofinas exógenas durante la EOC.

Respecto a las características de los ciclos de EOC, no encontramos en nuestro trabajo diferencias en los tipos de protocolo o dosis de gonadotrofinas empleadas para lograr un número adecuado de folículos entre las pacientes con RI y las pacientes normales. Estos datos están de acuerdo con los comunicados por otros autores como Welt y colaboradores (Welt y cols. 2003) y difieren de los observados por Fedorcsak y colaboradores (Fedorcsak y cols. 2000) en una muestra de pacientes con SOP y RI en las que constataban que presentaban niveles más bajos de estradiol y precisaban de dosis más altas de FSH durante la estimulación ovárica respecto a las mismas pacientes con SOP en la que no había RI, si bien esas diferencias desaparecían después de controlar el IMC. En nuestra muestra, las pacientes con RI no precisaron de dosis más altas de gonadotrofinas corroborando los datos de dicho autor para pacientes sin SOP en las que la RI no ejercía ninguna influencia en la respuesta a las gonadotrofinas, independientemente que presentasen o no obesidad abdominal.

En esta línea, otros autores han señalado que en pacientes que no han sido diagnosticadas de SOP, los niveles elevados de insulina circulante y de IGF-I se asocian con una mejor respuesta de los folículos antrales a las gonadotropinas (Meldrum y cols. 2013) y que los valores de HOMA-IR superiores a 2,5 se correlacionaban de forma positiva con el índice de andrógenos libres y con el recuento total de folículos durante la EOC (Dickerson y cols. 2010a); de esta forma, establecen la hipótesis de un posible efecto dual positivo de la insulina y los andrógenos sobre el ovario para promover la foliculogénesis temprana. Esta hipótesis también es sustentada por los datos de Nardo y colaboradores (Nardo y cols. 2009) quienes observaron en mujeres no obesas con SOP una relación positiva entre la RI y la hormona antimulleriana.

Considerados todos estos datos en su conjunto, parecen concluir que la acción positiva de la insulina sobre el ovario estaría asociada a la existencia de un ambiente androgénico, independientemente de que exista o no diagnóstico de SOP. En nuestro estudio no hemos podido determinar niveles de andrógenos por lo que no podemos confirmar ni refutar dicha hipótesis, aunque nuestros datos sí apoyarían los resultados de otros trabajos en los que se registra un incremento del estrés oxidativo en los oocitos de pacientes con RI, de manera que se encuentra una elevada concentración de moléculas reactivas que contienen oxígeno (ROS) o una reducción de la concentración de glutatión, junto a un deterioro de la función mitocondrial en la vesícula germinal y en el oocito en metafase II que sufrirían también una apoptosis precoz (Ou y cols. 2012a). Esta hipótesis sí podría explicar por qué en nuestra muestra se obtiene un número significativamente menor de oocitos fertilizados en las pacientes con $CA \geq 80$ cm en las que la incidencia de RI era del 81,3%, dado el estado de inflamación crónica y el mayor estrés oxidativo que se observa cuando existe obesidad abdominal.

La RI es uno de los componentes básicos del síndrome metabólico cuyas repercusiones en la salud de las personas están claramente establecidas para el riesgo cardiovascular o para el riesgo de diabetes mellitus, pero cuya influencia en el campo de la fertilidad permanece aún sin aclarar. En la actualidad existe un ensayo clínico abierto para dar respuesta a este interrogante (Clinical Trial NCT01958424). Nuestro estudio incluyó muy pocas pacientes que cumplieren los criterios exigidos para el diagnóstico de este síndrome, pero ninguna de ellas consiguió una gestación evolutiva.

En humanos la leptina sérica se asocia con la secreción de LH (Yu y cols. 1997), de modo que las situaciones en que hay déficit de leptina se altera la frecuencia del pico de LH, que puede ser revertida cuando se administra leptina exógena (Chan y cols. 2006). Por otro lado, los niveles elevados de leptina de forma crónica pueden ocasionar disfunción del eje neuroendocrino gonadal (Clement y cols. 1998) con un aumento de la expresión de GnRH mRNA en la hipófisis de las ratas obesas (Tulipano y cols. 2004). Debe considerarse también que la acción de la leptina sobre el eje neuroendocrino gonadal parece desencadenarse de forma indirecta (Quennell y cols. 2009), pudiendo regular la secreción de GnRH bien por vía directa o través de las neuronas KiSS-1 (Lehman, Coolen y Goodman 2010) siendo la Kisspetina el mediador más importante (Hameed, Jayasena y Dhillon 2011).

A nivel gonadal, la leptina ha sido inmunolocalizada en los oocitos humanos pudiendo ser transportada desde la sangre (Antczak y Van Blerkom 1997) o producida a nivel local en el propio ovario, en donde se han descrito funciones autocrinas y paracrinas que pudieran relacionarse con el normal desarrollo folicular y del cuerpo lúteo. En concreto, la acción de la leptina parece estar localizada a nivel de las células de la granulosa. En estas células se localizan receptores para la leptina y en ellas se ha demostrado la producción local de leptina (Sarkar y cols. 2010).

Almog y colaboradores (Almog y cols. 2011) demostraron que los niveles de leptina intrafolicular al final de la EOC no eran diferentes entre los distintos protocolos de EOC utilizados, lo que también fue constatado en nuestro estudio, ya que no observamos diferencias entre el protocolo corto con agonistas o con antagonistas de la GnRH ni tampoco entre las distintas dosis o tipos de gonadotrofinas empleadas.

Dada la relación entre RI y niveles séricos de leptina, no es extraño pensar en una posible relación entre RI y los niveles de leptina intrafolicular. En nuestra muestra hemos encontrado una correlación positiva y estadísticamente significativa entre RI y los niveles intrafoliculares de leptina la cual no había sido descrita previamente en mujeres sin diagnóstico de SOP. Este hallazgo discrepa en parte de los resultados de otros autores como Takikawa y colaboradores (Takikawa y cols. 2010) que en una muestra corta de pacientes no encuentran una correlación significativa entre la insulina y la leptina intrafolicular, o de los datos comunicados por Fedorcsarck y colaboradores (Fedorcsak y cols. 2000) quienes en una muestra de 20 pacientes con SOP tampoco observa correlación entre RI y leptina intrafolicular.

Aunque la leptina tiene un papel indudable en el proceso reproductivo, su complejo mecanismo de acción no ha sido totalmente elucidado a nivel ovárico. Se conoce que la leptina y su receptor se expresan en los folículos en diferentes momentos del ciclo (Ryan y cols. 2002) y estudios “in vitro” han demostrado un efecto directo de la leptina sobre la proliferación, apoptosis y señalización intracelular en las células ováricas (Sirotkin y cols. 2008). Algunos trabajos han relacionado la leptina con una maduración mejor de los oocitos (Paula-Lopes y cols. 2007), pero sus niveles deben de encontrarse dentro de unos límites fisiológicos, ya que estudios realizados en bovinos encuentran que los niveles de leptina se relaciona de modo inverso con los niveles de estradiol intrafolicular, un marcador indirecto de la maduración del folículo (Sarkar y cols. 2010). En este sentido, otro estudio realizado en ratones, también observó que se produce una inhibición del desarrollo y el crecimiento folicular cuando se administra leptina recombinante (Swain y cols. 2004). En nuestra muestra no hemos encontrado

una correlación estadísticamente significativa entre los niveles intrafoliculares de leptina y los valores séricos de estradiol al final de la EOC, ni entre los niveles intrafoliculares de leptina y el número de oocitos en metafase II, pero sí que constatamos una clara correlación negativa entre dichos niveles y el número de oocitos fertilizados y la posibilidad de gestación con nacido vivo.

Al igual que otros autores (Welt y cols. 2003), no hemos encontrado ninguna relación entre los niveles de leptina intrafolicular y los marcadores de la calidad oocitaria o grado de calidad embrionaria. Estos hallazgos discrepan de los comunicados por Anifandis y colaboradores. (Anifandis y cols. 2005) que aprecian una peor calidad embrionaria con niveles elevados de leptina sérica e intrafolicular; si bien en su estudio los valores medios de leptina intrafolicular eran muchos más elevados que en nuestro estudio.

A pesar de no observar esta correlación negativa entre los niveles intrafoliculares de leptina y la calidad embrionaria, sí que apreciamos en nuestro estudio una clara correlación negativa entre los niveles intrafoliculares de leptina y la posibilidad de gestación. Estos resultados están de acuerdo con Mantzoros y colaboradores (Mantzoros y cols. 2000) que observaron que las concentraciones bajas de leptina intrafolicular podrían ser un marcador del éxito de los tratamientos de reproducción asistida y que en las mujeres con SOP se registraban concentraciones de leptina intrafolicular más altas que las pacientes normales, incluso después de ajustar para el IMC. Nuestro estudio no considera a las pacientes con SOP, ya que en dichas pacientes los cambios hormonales asociados a la hiperplasia de la teca y la RI dificultan el estudio del verdadero papel de leptina intrafolicular, pero resultan más consistentes al considerar que esta correlación

resulta ser aún más significativa cuando distinguíamos entre las gestaciones que finalizaban en aborto y las que evolucionaban de forma fisiológica.

Datos de investigación básica podrían explicar esta correlación. Estudios “in vitro” en células de la granulosa y de la teca encuentran un papel negativo de la leptina en la función ovárica (Karamouti y cols. 2009); principalmente, sobre la esteroidogénesis mediada por LH y IGF-I e insulina (Agarwal y cols. 1999) o por una acción mediada por el óxido nítrico que inhibiría la actividad aromatasa (Huang y cols. 2005).

En la literatura hay también trabajos que discrepan de nuestros resultados y no constatan esta relación entre altos niveles de leptina intrafolicular y posibilidad de gestación evolutiva. Así Chen y colaboradores (Chen y cols. 2004), Asimakopoulos y colaboradores (Asimakopoulos y cols. 2009) y Almog y colaboradores (Almog y cols. 2011) no observaron ninguna relación entre los niveles séricos o foliculares de leptina con los resultados de la FIV. Un único trabajo (De Placido y cols. 2006) encuentra justo resultados opuestos a los hallados en el presente trabajo, ya que en dicho estudio se encontraba una relación directa entre los niveles intrafoliculares de leptina y la probabilidad de fertilización del oocito; si bien estos resultados deben de tomarse con precaución al ser un estudio con un tamaño muestral pequeño (37 casos) y emplear protocolos de EOC diferentes de los habituales a causa de las peculiaridades de la legislación italiana sobre FIV/ICSI.

En la mayoría de estas investigaciones existen diferencias metodológicas importantes. Por ejemplo, en algunos se realizó la determinación de leptina

intrafolicular en todo el “pool” de folículos puncionados, en lugar de en un solo folículo seleccionado como en nuestro estudio o en los estudios que encuentran resultados similares a los nuestros. Las metodologías no son, por tanto, equiparables, ya que cuando se estudia todo el pool folicular buscando una evaluación más completa de la cantidad de leptina intrafolicular en el ovario, se producen diversas variables de confusión que podrían alterar los resultados como serían: la dificultad para puncionar exactamente todos los folículos del ovario, la dificultad para correlacionar exactamente el nivel de leptina con el tamaño de cada folículo y la mayor posibilidad de contaminación por sangre y o células del estroma ovárico.

El coste económico y emocional de los ciclos de FIV/ICSI, especialmente cuando la implantación no se produce o cuando ocurre, pero el embarazo finaliza con un aborto, justifican los intentos de investigar para conseguir herramientas con las que poder predecir la posibilidad de éxito de la técnica. En este sentido hemos considerado el desarrollo de un modelo predictivo para mejorar la información que las parejas solicitan con el fin de ayudarles a tomar la decisiones. Para ello, en un primer paso se incluyeron todas las variables en un algoritmo automático basado en razón de verosimilitud para su selección y, posteriormente, se eligieron aquellas variables que en razón de la evidencia científica parecen estar relacionadas en la clínica con la probabilidad de gestación, una vez eliminadas las posibles variables de confusión. De este modo, se obtuvo el modelo matemático propuesto cuya fórmula combina 3 variables fáciles de obtener en la clínica con un mínimo incremento económico del coste del ciclo de FIV/ICSI. La sensibilidad y especificidad que ese modelo alcanzó en nuestro estudio es alta y justificaría el ensayo de dicho método en una población más amplia para comprobar su correcto funcionamiento ya que tal como señalan Coppus y

colaboradores (Coppus y cols 2009) señalan, en medicina reproductiva no existe un modelo pronóstico perfecto para predecir la gestación en parejas que se someten a FIV/ICSI; sin embargo, modelos predictivos bien calibrados y con suficiente variabilidad en el cálculo de probabilidades, podrían usarse para apoyar la toma de decisiones, considerando que el área bajo la curva ROC expresa únicamente la posibilidad de discriminación del modelo y que para evaluar el valor real de dicho modelo es necesario reclasificar las probabilidades en la clínica para conocer el verdadero rendimiento del test.

El presente estudio tiene algunas limitaciones, similares al resto de los estudios que se han efectuado en este campo. En primer lugar, el hecho de que la leptina haya sido medida solo en el primer folículo puncionado aporta únicamente una estimación de lo que podría ocurrir en el resto de los folículos del ovario, aunque evita también las desviaciones antes comentadas. En segundo lugar, diversos parámetros postinseminación relacionados con la fertilización y la implantación no han sido evaluados en profundidad, pero no se observaron diferencias en la calidad del semen o en las patologías uterinas entre las pacientes que iniciaron el estudio. En tercer lugar, aunque nuestro trabajo refuerza el concepto de que la leptina intrafolicular se comporta como un predictor del éxito en FIV, no suministra información precisa de los mecanismos últimos a través de los cuales actúa; si bien, parece razonable pensar que los mismos mecanismos descritos en los estudios “in vitro” podrían ser similares. Finalmente, tampoco se ha considerado el posible papel de la leptina sobre la implantación y el desarrollo embrionario, por el propio diseño del estudio, pero su acción a nivel endometrial (Dos Santos y cols. 2012) o sobre la respuesta inmune (Mor y cols. 2011), dadas las posibles influencias de la leptina en la homeostasis tímica, la

interleuquina-1, el TNF- α o la diferenciación de T helper 1 (Procaccini, Jirillo y Matarese 2011); así como otras posibles influencias de la leptina en la regulación del proceso de implantación embrionaria (Cervero y cols. 2006), deberían de incluirse en el diseño de futuros estudios para corroborar los resultados obtenidos.

Considerando estas limitaciones, se pueden alcanzar las siguientes conclusiones como respuesta a los objetivos planteados:

VII. CONCLUSIONES

Conclusión 1:

La resistencia a la insulina se relaciona de forma positiva con los niveles intrafoliculares de leptina, los cuales influyen negativamente en los resultados de FIV/ICSI.

Conclusión 2:

Las pacientes con obesidad abdominal presentan con más frecuencia resistencia a la insulina y tienen niveles intrafoliculares de leptina más elevados, pero no pueden extraerse conclusiones fiables sobre su relación con la tasa de gestación con nacido vivo debido al tamaño muestral.

Conclusión 3:

El tipo de protocolo empleado en la EOC y los valores de estrógenos alcanzados al final de la EOC no influyen en los niveles de leptina intrafolicular.

Conclusión 4:

La combinación del número de folículos y los niveles de progesterona séricos al final de la EOC junto a los niveles intrafoliculares de leptina, con arreglo al modelo diagnóstico propuesto, predice la probabilidad de gestación con nacido vivo en los ciclos de FIV/ICSI con un buen nivel de discriminación. Por lo tanto, sería recomendable su utilización en un futuro ensayo clínico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, S.K., Vogel, K., Weitsman, S.R. & Magoffin, D.A. 1999, "Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary", *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 84, no.3. pp 1072-1076.

Ajduk, A., Ilozue, T., Windsor, S., Yu, Y., Seres, K.B., Bompfrey, R.J., Tom, B.D., Swann, K., Thomas, A., Graham, C. & Zernicka-Goetz, M. 2011, "Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability", *Nat Commun*, vol. 2, pp. 417.

Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.C., James, W.P., Loria, C.M., Smith, S.C., Jr, International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society & International Association for the Study of Obesity 2009, "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity", *Circulation*, vol. 120, no. 16, pp. 1640-1645.

Almog, B., Azem, F., Kapustiansky, R., Azolai, J., Wagman, I., Levin, I., Hauser, R., Pauzner, D., Lessing, J.B., Amit, A. & Gamzu, R. 2011, "Intrafollicular and serum levels of leptin during in vitro fertilization cycles: comparison between the

effects of recombinant follicle-stimulating hormones and human menopausal gonadotrophin", *Gynecol Endocrinol*, vol. 27, no. 9, pp. 666-668.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011, "The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting", *Hum Reprod*, vol. 26, no. 6, pp. 1270-1283.

Altmae, S., Esteban, F.J., Stavreus-Evers, A., Simon, C., Giudice, L., Lessey, B.A., Horcajadas, J.A., Macklon, N.S., D'Hooghe, T., Campoy, C., Fauser, B.C., Salamonsen, L.A. & Salumets, A. 2014, "Guidelines for the design, analysis and interpretation of 'omics' data: focus on human endometrium", *Hum Reprod Update*, vol. 20, no. 1, pp. 12-28.

Alvarez-Castro, P., Sangiao-Alvarellos, S., Brandon-Sanda, I. & Cordido, F. 2011, "Endocrine function in obesity", *Endocrinol Nutr*, vol. 58, no. 8, pp. 422-432.

Anifandis, G., Koutselini, E., Stefanidis, I., Liakopoulos, V., Leivaditis, C., Mantzavinos, T. & Vamvakopoulos, N. 2005, "Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality", *Reproduction*, vol. 130, no. 6, pp. 917-921.

Antczak, M. & Van Blerkom, J. 1997, "Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo", *Mol Hum Reprod*, vol. 3, no. 12, pp. 1067-1086.

Aranceta J., Serra Ll., Foz M., Moreno B. y Grupo colaborativo de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). 2005, "Prevalencia de obesidad en España". *Med Clin*, vol. 125, no. 12, pp. 460-466.

Araki, E., Haag, B.L.,3rd, Matsuda, K., Shichiri, M. & Kahn, C.R. 1995, "Characterization and regulation of the mouse insulin receptor substrate gene promoter", *Mol Endocrinol*, vol. 9, no. 10, pp. 1367-1379.

Arriola, D.J., Mayo, S.L., Skarra, D.V., Benson, C.A. & Thackray, V.G. 2012, "FOXO1 transcription factor inhibits luteinizing hormone beta gene expression in pituitary gonadotrope cells", *J Biol Chem*, vol. 287, no. 40, pp. 33424-33435.

ASEBIR. "II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos". *Cuadernos de Embriología Clínica* (2ª Edición)

Asimakopoulos, B., Koster, F., Felberbaum, R., Tripsiannis, G., Caglar, G.S., Nikolettos, N., Al-Hasani, S. & Diedrich, K. 2009, "Intrafollicular and circulating concentrations of leptin do not predict the outcome in IVF-ICSI cycles", *Reprod Sci*, vol. 16, no. 1, pp. 113-119.

Azziz, R., Ehrmann, D.A., Legro, R.S., Fereshetian, A.G., O'Keefe, M., Ghazzi, M.N. & PCOS/Troglitazone Study Group 2003, "Troglitazone decreases adrenal androgen levels in women with polycystic ovary syndrome", *Fertil Steril*, vol. 79, no. 4, pp. 932-937.

Barr, V.A., Malide, D., Zarnowski, M.J., Taylor, S.I. & Cushman, S.W. 1997, "Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue", *Endocrinology*, vol. 138, no. 10, pp. 4463-4472.

Bellver, J., Ayllon, Y., Ferrando, M., Melo, M., Goyri, E., Pellicer, A., Remohi, J. & Meseguer, M. 2010, "Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality", *Fertil Steril*, vol. 93, no. 2, pp. 447-454.

Bellver, J., Melo, M.A., Bosch, E., Serra, V., Remohi, J. & Pellicer, A. 2007, "Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium", *Fertil Steril*, vol. 88, no. 2, pp. 446-451.

Bellver, J., Pellicer, A., Garcia-Velasco, J.A., Ballesteros, A., Remohi, J. & Meseguer, M. 2013, "Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors", *Fertil Steril*, vol. 100, no. 4, pp 1050-1058.

Bergh, C., Carlsson, B., Olsson, J.H., Selleskog, U. & Hillensjo, T. 1993, "Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin", *Fertil Steril*, vol. 59, no. 2, pp. 323-331.

Bluher, S. & Mantzoros, C.S. 2009, "Leptin in humans: lessons from translational research", *Am J Clin Nutr*, vol. 89, no. 3, pp. 991S-997S.

Boden, G., Chen, X., Kolaczynski, J.W. & Polansky, M. 1997, "Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects", *J Clin Invest*, vol. 100, no. 5, pp. 1107-1113.

Bohler, H., Jr, Mokshagundam, S. & Winters, S.J. 2010, "Adipose tissue and reproduction in women", *Fertil Steril*, vol. 94, no. 3, pp. 795-825.

Brogan, R.S., Mix, S., Puttabyatappa, M., VandeVoort, C.A. & Chaffin, C.L. 2010, "Expression of the insulin-like growth factor and insulin systems in the luteinizing macaque ovarian follicle", *Fertil Steril*, vol. 93, no. 5, pp. 1421-1429.

Brothers, K.J., Wu, S., DiVall, S.A., Messmer, M.R., Kahn, C.R., Miller, R.S., Radovick, S., Wondisford, F.E. & Wolfe, A. 2010, "Rescue of obesity-induced infertility in female mice due to a pituitary-specific knockout of the insulin receptor", *Cell Metab*, vol. 12, no. 3, pp. 295-305.

Butzow, T.L., Moilanen, J.M., Lehtovirta, M., Tuomi, T., Hovatta, O., Sieberg, R., Nilsson, C.G. & Apter, D. 1999, "Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response", *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 84, no. 9, pp. 3135-3139.

Cai, D., Dhe-Paganon, S., Melendez, P.A., Lee, J. & Shoelson, S.E. 2003, "Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5", *J Biol Chem*, vol. 278, no. 28, pp. 25323-25330.

Cervero, A., Dominguez, F., Horcajadas, J.A., Quinonero, A., Pellicer, A. & Simon, C. 2006, "The role of the leptin in reproduction", *Current Opinion in Obstet Gynecol*, vol. 18, no. 3, pp. 297-303.

Chan, J.L., Matarese, G., Shetty, G.K., Raciti, P., Kelesidis, I., Aufiero, D., De Rosa, V., Perna, F., Fontana, S. & Mantzoros, C.S. 2006, "Differential regulation of metabolic, neuroendocrine, and immune function by leptin in humans", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 22, pp. 8481-8486.

Chen, H., Sullivan, G., Yue, L.Q., Katz, A. & Quon, M.J. 2003, "QUICKI is a useful index of insulin sensitivity in subjects with hypertension", *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 284, no. 4, pp. E804-12.

Chen, R., Fisch, B., Ben-Haroush, A., Kaplan, B., Hod, M. & Orvieto, R. 2004, "Serum and follicular fluid leptin levels in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization cycle", *Clin Exp Obstet Gynecol*, vol. 31, no. 2, pp. 103-106.

Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P. & Guy-Grand, B. 1998, "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction", *Nature*, vol. 392, no. 6674, pp. 398-401.

Codner, E., Merino, P.M. & Tena-Sempere, M. 2012, "Female reproduction and type 1 diabetes: from mechanisms to clinical findings", *Hum Reprod Update*, vol. 18, no. 5, pp. 568-585.

Comninou, A.N., Jayasena, C.N. & Dhillon, W.S. 2013, "The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction", *Hum Reprod Update*, vol 20, no. 2, pp. 153-174.

Coppus SF, van der Veen F, Opmeer BC, Mol BW & Bossuyt PM. 2009, "Evaluating prediction models in reproductive medicine", *Hum Reprod*, vol. 24, no 8 pp 1774-1778.

De La Croix, D. 2012, "Fertility, education, growth, and sustainability", *Cambridge University Press*.

De Mouzon, J., Goossens, V., Bhattacharya, S., Castilla, J.A., Ferraretti, A.P., Korsak, V., Kupka, M., Nygren, K.G., Andersen, A.N., European IVF-Monitoring (EIM) & Consortium for the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE) 2012, "Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE", *Hum Reprod*, vol. 27, no. 4, pp. 954-966.

De Placido, G., Alviggi, C., Clarizia, R., Mollo, A., Alviggi, E., Strina, I., Fiore, E., Wilding, M., Pagano, T. & Matarese, G. 2006, "Intra-follicular leptin concentration

as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques", *J Endocrinol Invest*, vol. 29, no. 8, pp. 719-726.

Dickerson, E.H., Cho, L.W., Maguiness, S.D., Killick, S.L., Robinson, J. & Atkin, S.L. 2010a, "Insulin resistance and free androgen index correlate with the outcome of controlled ovarian hyperstimulation in non-PCOS women undergoing IVF", *Hum Reprod*, vol. 25, no. 2, pp. 504-509.

Dickerson, E.H., Cho, L.W., Maguiness, S.D., Killick, S.L., Robinson, J. & Atkin, S.L. 2010b, "Insulin resistance and free androgen index correlate with the outcome of controlled ovarian hyperstimulation in non-PCOS women undergoing IVF", *Hum Reprod*, vol. 25, no. 2, pp. 504-509.

Dos Santos, E., Serazin, V., Morvan, C., Torre, A., Wainer, R., de Mazancourt, P. & Dieudonne, M.N. 2012, "Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation", *Fertil Steril*, vol. 97, no. 3, pp. 771-778.

Duncan, M.H., Singh, B.M., Wise, P.H., Carter, G. & Alaghband-Zadeh, J. 1995, "A simple measure of insulin resistance", *Lancet*, vol. 346, no. 8967, pp. 120-121.

Dupont, J. & LeRoith, D. 2001, "Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction", *Horm Res*, vol. 55 Suppl 2, pp. 22-26.

Eckel, R.H., Grundy, S.M. & Zimmet, P.Z. 2005, "The metabolic syndrome", *Lancet*, vol. 365, no. 9468, pp. 1415-1428.

ESHRE Capri Workshop Group 2012, "Health and fertility in World Health Organization group 2 anovulatory women", *Hum Reprod Update*, vol. 18, no 5, pp 586-599.

Fedorcsak, P., Storeng, R., Dale, P.O., Tanbo, T., Torjesen, P., Urbancsek, J. & Abyholm, T. 2000, "Leptin and leptin binding activity in the preovulatory follicle of polycystic ovary syndrome patients", *Scand J Clin Lab Invest*, vol. 60, no. 8, pp. 649-655.

Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G.H., Zhao, C., Darnell, R. & Friedman, J.M. 1997, "Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 13, pp. 7001-7005.

Ferraretti, A.P., La Marca, A., Fauser, B.C., Tarlatzis, B., Nargund, G., Gianaroli, L. & ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition 2011, "ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria", *Hum Reprod*, vol. 26, no. 7, pp. 1616-1624.

Freeman, E.W., Gracia, C.R., Sammel, M.D., Lin, H., Lim, L.C. & Strauss, J.F., 3rd 2007, "Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women", *Fertil Steril*, vol. 87, no. 1, pp. 101-106.

Genc, G., Yilmaz, N., Uygur, D., Dogan, M. & Mollamahmutoglu, L. 2011, "The effect of intrafollicular IGF 1 and IGFBP 3 on IVF outcome in patients using different gonadotropins: a prospective study", *J Assist Reprod Genet*, vol. 28, no. 5, pp. 405-410.

Gianaroli, L., Magli, M.C., Ferraretti, A.P., Fortini, D. & Grieco, N. 2003, "Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection", *Fertil Steril*, vol. 80, no. 2, pp. 341-349.

Gonen Y. & Casper R. 1990, "Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF)" *J In Vitro Fert Embryo Transf*, vol 7, no. 3, pp. 146-52.

Hameed, S., Jayasena, C.N. & Dhillon, W.S. 2011, "Kisspeptin and fertility", *J Endocrinol*, vol. 208, no. 2, pp. 97-105.

Harper, M.E., Ullrich, A. & Saunders, G.F. 1981, "Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 78, no. 7, pp. 4458-4460.

Hill, J.W., Elias, C.F., Fukuda, M., Williams, K.W., Berglund, E.D., Holland, W.L., Cho, Y.R., Chuang, J.C., Xu, Y., Choi, M., Lauzon, D., Lee, C.E., Coppari, R., Richardson, J.A., Zigman, J.M., Chua, S., Scherer, P.E., Lowell, B.B., Bruning, J.C. & Elmquist, J.K. 2010, "Direct insulin and leptin action on pro-

opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility", *Cell Metab*, vol. 11, no. 4, pp. 286-297.

Holte, J., Berglund, L., Milton, K., Garello, C., Gennarelli, G., Revelli, A. & Bergh, T. 2007, "Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval", *Hum Reprod*, vol. 22, no. 2, pp. 548-557.

Horcajadas, J.A., Riesewijk, A., Dominguez, F., Cervero, A., Pellicer, A. & Simon, C. 2004, "Determinants of endometrial receptivity", *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1034, pp. 166-175.

Huang, H.F., Wang, B., Yang, X.F., Luo, Q. & Sheng, J.Z. 2005, "Nitric oxide mediates inhibitory effect of leptin on insulin-like growth factor I augmentation of 17beta-estradiol production in human granulosa cells", *Biol Reprod*, vol. 72, no. 1, pp. 102-106.

INE, <http://www.ine.es/>

Karamouti, M., Kollia, P., Kallitsaris, A., Vamvakopoulos, N., Kollios, G. & Messinis, I.E. 2009, "Modulating effect of leptin on basal and follicle stimulating hormone stimulated steroidogenesis in cultured human lutein granulosa cells", *J Endocrinol Invest*, vol. 32, no. 5, pp. 415-419.

Kennedi, G.C. & Mitra, J. 1963, "Hypothalamic control of energy balance and the reproductive cycle in the rat", *J Physiol*, vol. 166, pp. 395-407.

Kezele, P.R., Nilsson, E.E. & Skinner, M.K. 2002, "Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition", *Mol Cell Endocrinol*, vol. 192, no. 1-2, pp. 37-43.

Krentz, A.J. & Natrass, M. 1996, "Insulin resistance: a multifaceted metabolic syndrome. Insights gained using a low-dose insulin infusion technique", *Diabet Med*, vol. 13, no. 1, pp. 30-39.

Kwintkiewicz, J. & Giudice, L.C. 2009, "The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function", *Semin Reprod Med*, vol. 27, no. 1, pp. 43-51.

Laufer, N. & Simon, A. 2012, "Recurrent implantation failure: current update and clinical approach to an ongoing challenge", *Fertil Steril*, vol. 97, no. 5, pp. 1019-1020.

Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Aouadi, M., Gremeaux, T., Binetruy, B., Bost, F. & Tanti, J.F. 2006, "Obesity, diabetes and insulin resistance. Alterations of insulin signalling", *J Soc Biol*, vol. 200, no. 1, pp. 93-97.

Lee, J., Pilch, P.F., Shoelson, S.E. & Scarlata, S.F. 1997, "Conformational changes of the insulin receptor upon insulin binding and activation as monitored by fluorescence spectroscopy", *Biochemistry*, vol. 36, no. 9, pp. 2701-2708.

Legro, R.S., Finegood, D. & Dunaif, A. 1998, "A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 83, no. 8, pp. 2694-2698.

Lehman, M.N., Coolen, L.M. & Goodman, R.L. 2010, "Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion", *Endocrinology*, vol. 151, no. 8, pp. 3479-3489.

Lewis, G.F. 2013, "Devastating metabolic consequences of a life of plenty: focus on the dyslipidemia of overnutrition", *Clin Invest Med*, vol. 36, no 5, pp 242-249.

Licinio, J., Mantzoros, C., Negrao, A.B., Cizza, G., Wong, M.L., Bongiorno, P.B., Chrousos, G.P., Karp, B., Allen, C., Flier, J.S. & Gold, P.W. 1997, "Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function", *Nat Med*, vol. 3, no. 5, pp. 575-579.

Loh, K., Fukushima, A., Zhang, X., Galic, S., Briggs, D., Enriori, P.J., Simonds, S., Wiede, F., Reichenbach, A., Hauser, C., Sims, N.A., Bence, K.K., Zhang, S., Zhang, Z.Y., Kahn, B.B., Neel, B.G., Andrews, Z.B., Cowley, M.A. & Tiganis, T.

2011, "Elevated Hypothalamic TCPTP in Obesity Contributes to Cellular Leptin Resistance", *Cell Metab*, vol 14, no.5, pp 684-699.

Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Ruberti, A. & Farfalli, V. 2007, "Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement", *Fertil Steril*, vol. 87, no. 3, pp. 534-541.

Magoffin, D.A. & Weitsman, S.R. 1994, "Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells", *Biol Reprod*, vol. 51, no. 4, pp. 766-775.

Mantzoros, C.S., Cramer, D.W., Liberman, R.F. & Barbieri, R.L. 2000, "Predictive value of serum and follicular fluid leptin concentrations during assisted reproductive cycles in normal women and in women with the polycystic ovarian syndrome", *Hum Reprod*, vol. 15, no. 3, pp. 539-544.

Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G. & Hill, R.A. 2002, "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions", *Int J Obes Relat Metab Disord*, vol. 26, no. 11, pp. 1407-1433.

Mason, H.D., Willis, D.S., Holly, J.M. & Franks, S. 1994, "Insulin preincubation enhances insulin-like growth factor-II (IGF-II) action on steroidogenesis in human granulosa cells", *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 78, no. 5, pp. 1265-1267.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. & Turner, R.C. 1985, "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man", *Diabetologia*, vol. 28, no. 7, pp. 412-419.

Meldrum, D.R., Chang, R.J., Giudice, L.C., Balasch, J. & Barbieri, R.L. 2013, "Role of decreased androgens in the ovarian response to stimulation in older women", *Fertil Steril*, vol. 99, no. 1, pp. 5-11.

Menken, J., Trussell, J. & Larsen, U. 1986, "Age and infertility", *Science*, vol. 233, no. 4771, pp. 1389-1394.

Metwally, M., Cutting, R., Tipton, A., Skull, J., Ledger, W.L. & Li, T.C. 2007, "Effect of increased body mass index on oocyte and embryo quality in IVF patients", *Reprod Biomed Online*, vol. 15, no. 5, pp. 532-538.

Mlinar B., Marc J., Janez A. & Pfeifer M. 2007, "Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases", *Clin Chim Acta*, vol 375, no 5, pp 20–35.

Monget, P. & Bondy, C. 2000, "Importance of the IGF system in early folliculogenesis", *Mol Cell Endocrinol*, vol. 163, no. 1-2, pp. 89-93.

Moore, S.C. 2009, "Waist versus weight: which matters more for mortality?", *Am J Clin Nutr*, vol. 89, no. 4, pp. 1003-1004.

Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V. & Guller, S. 2011, "Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site", *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1221, pp. 80-87.

Munne, S. 2006, "Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos", *Reprod Biomed Online*, vol. 12, no. 2, pp. 234-253.

Myers, M.G., Cowley, M.A. & Munzberg, H. 2008, "Mechanisms of leptin action and leptin resistance", *Annu Rev Physiol*, vol. 70, pp. 537-556.

Nagy, Z.P., Dozortsev, D., Diamond, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Abdelmassih, R. & Greco, E. 2003, "Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates", *Fertil Steril*, vol. 80, no. 1, pp. 67-74.

Nakao, K. 2009, "Adiposcience and adipotoxicity", *Nat Clin Pract. Endocrinol Metab*, vol. 5, no. 2, pp. 63.

Nardo, L.G., Yates, A.P., Roberts, S.A., Pemberton, P. & Laing, I. 2009, "The relationships between AMH, androgens, insulin resistance and basal ovarian follicular status in non-obese subfertile women with and without polycystic ovary syndrome", *Hum Reprod*, vol. 24, no. 11, pp. 2917-2923.

Nestler, J.E., Barlascini, C.O., Matt, D.W., Steingold, K.A., Plymate, S.R., Clore, J.N. & Blackard, W.G. 1989, "Suppression of serum insulin by diazoxide reduces serum testosterone levels in obese women with polycystic ovary syndrome", *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 68, no. 6, pp. 1027-1032.

Ou, X.H., Li, S., Wang, Z.B., Li, M., Quan, S., Xing, F., Guo, L., Chao, S.B., Chen, Z., Liang, X.W., Hou, Y., Schatten, H. & Sun, Q.Y. 2012a, "Maternal insulin resistance causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mouse oocytes", *Hum Reprod*, vol. 27, no. 7, pp. 2130-2145.

Paula-Lopes, F.F., Boelhaue, M., Habermann, F.A., Sinowatz, F. & Wolf, E. 2007, "Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms", *Biol Reprod*, vol. 76, no. 3, pp. 532-541.

Petraglia, F., Serour, G.I. & Chapron, C. 2013, "The changing prevalence of infertility", *Int J Gynaecol Obstet*, vol. 123 Suppl 2, pp. S4-8.

Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R.P. & Harmon, J.S. 2006, "Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids", *J Nutr*, vol. 136, no. 4, pp. 873-876.

Poretsky, L., Cataldo, N.A., Rosenwaks, Z. & Giudice, L.C. 1999a, "The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease", *Endocr Rev*, vol. 20, no. 4, pp. 535-582.

Poretsky, L., Cataldo, N.A., Rosenwaks, Z. & Giudice, L.C. 1999b, "The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease", *Endocr Rev*, vol. 20, no. 4, pp. 535-582.

Poretsky, L. & Piper, B. 1994, "Insulin resistance, hypersecretion of LH, and a dual-defect hypothesis for the pathogenesis of polycystic ovary syndrome", *Obstet Gynecol*, vol. 84, no. 4, pp. 613-621.

Pouliot, M.C., Despres, J.P., Lemieux, S., Moorjani, S., Bouchard, C., Tremblay, A., Nadeau, A. & Lupien, P.J. 1994, "Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women", *Am J Cardiol*, vol. 73, no. 7, pp. 460-468.

Pouly, J.L., Ouziel, L., Gremeau, A.S., De Mouzon, J., Janny, L., Vignancour, S., Dejou, L. & Brugnon, F. 2012, "Factors affecting the cumulative live birth rate in IVF cycles. Retrospective analysis of a 1001 couples cohort", *Gynecol Obstet Fertil*, vol. 40, no. 4, pp. 219-225.

Procaccini, C., Jirillo, E. & Matarese, G. 2012, "Leptin as an immunomodulator", *Mol Aspects Med*, vol 33, no 1, pp 35-45.

Quennell, J.H., Mulligan, A.C., Tups, A., Liu, X., Phipps, S.J., Kemp, C.J., Herbison, A.E., Grattan, D.R. & Anderson, G.M. 2009, "Leptin indirectly regulates

gonadotropin-releasing hormone neuronal function", *Endocrinology*, vol. 150, no. 6, pp. 2805-2812.

Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T. & Mandelbaum, J. 2012, "The oocyte", *Hum Reprod*, vol. 27 Suppl 1, pp. i2-21.

Ryan, N.K., Woodhouse, C.M., Van der Hoek, K.H., Gilchrist, R.B., Armstrong, D.T. & Norman, R.J. 2002, "Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation", *Biol Reprod*, vol. 66, no. 5, pp. 1548-1554.

Sanz Paris, A., Guallar Labrador, A.M. & Albero Gamboa, R. 1999, "Leptin in the endocrinology of obesity". *An Med Intern*, vol. 10, no. 10, pp. 530-540.

Sarkar, M., Schilffarth, S., Schams, D., Meyer, H.H. & Berisha, B. 2010, "The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary", *Mol Reprod Dev*, vol. 77, no. 2, pp. 174-181.

Savage, D.B., Petersen, K.F. & Shulman, G.I. 2005, "Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation", *Hypertension*, vol. 45, no. 5, pp. 828-833.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr, Seeley, R.J. & Baskin, D.G. 2000, "Central nervous system control of food intake", *Nature*, vol. 404, no. 6778, pp. 661-671.

Shea, S.A., Hilton, M.F., Orlova, C., Ayers, R.T. & Mantzoros, C.S. 2005, "Independent circadian and sleep/wake regulation of adipokines and glucose in humans", *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 90, no. 5, pp. 2537-2544.

Singh, B. & Saxena, A. 2010, "Surrogate markers of insulin resistance: A review", *World J Diabetes*, vol. 1, no. 2, pp. 36-47.

Sirotkin, A.V.; Mlyncek, M.; Makarevich, A.V.; Florkovicova, I. & Hetenyi, L. 2008, "Leptin affects proliferation, apoptosis- and protein kinase A-related peptides in human ovarian granulosa cells", *Physiol Res*, vol 57, no 3, pp 437-442.

Swain, J.E., Dunn, R.L., McConnell, D., Gonzalez-Martinez, J. & Smith, G.D. 2004, "Direct effects of leptin on mouse reproductive function: regulation of follicular, oocyte, and embryo development", *Biol Reprod*, vol. 71, no. 5, pp. 1446-1452.

Swain, J.E. & Pool, T.B. 2008, "ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization", *Hum Reprod Update*, vol. 14, no. 5, pp. 431-446.

Tanizawa, Y., Okuya, S., Ishihara, H., Asano, T., Yada, T. & Oka, Y. 1997, "Direct stimulation of basal insulin secretion by physiological concentrations of leptin in pancreatic beta cells", *Endocrinology*, vol. 138, no. 10, pp. 4513-4516.

Takikawa, S., Iwase, A., Goto, M., Harata, T., Umezu, T., Nakahara, T., Kobayashi, H., Suzuki, K., Manabe, S. & Kikkawa, F. 2010, "Assessment of the predictive value of follicular fluid insulin, leptin and adiponectin in assisted reproductive cycles", *Gynecol.Endocrinol*, vol 26, no 7, pp 494-499.

Tersigni, C., Di Nicuolo, F., D'Ippolito, S., Veglia, M., Castellucci, M. & Di Simone, N. 2011, "Adipokines: new emerging roles in fertility and reproduction", *Obstet Gynecol Surv*, vol. 66, no. 1, pp. 47-63.

Thomas, G.N., Critchley, J.A., Tomlinson, B., Anderson, P.J., Lee, Z.S. & Chan, J.C. 2000, "Obesity, independent of insulin resistance, is a major determinant of blood pressure in normoglycemic Hong Kong Chinese", *Metabolism*, vol. 49, no. 12, pp. 1523-1528.

Tingthanatikul, Y., Choktanasiri, W., Rochanawutanon, M. & Weerakeit, S. 2006, "Prevalence and clinical predictors of endometrial hyperplasia in anovulatory women presenting with amenorrhea", *Gynecol Endocrinol*, vol. 22, no. 2, pp. 101-105.

Tulipano, G., Vergoni, A.V., Soldi, D., Muller, E.E. & Cocchi, D. 2004, "Characterization of the resistance to the anorectic and endocrine effects of leptin in obesity-prone and obesity-resistant rats fed a high-fat diet", *J Endocrinol*, vol. 183, no. 2, pp. 289-298.

Vlaisavljevic, V., Kovac, V. & Sajko, M.C. 2009, "Impact of insulin resistance on the developmental potential of immature oocytes retrieved from human chorionic gonadotropin-primed women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro maturation", *Fertil Steril*, vol. 91, no. 3, pp. 957-959.

Wauman, J. & Tavernier, J. 2011, "Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance", *Front Biosci*, vol. 17, pp. 2771-2793.

Welt, C.K., Schneyer, A.L., Heist, K. & Mantzoros, C.S. 2003, "Leptin and soluble leptin receptor in follicular fluid", *J Assist Reprod Genet*, vol. 20, no. 12, pp. 495-501.

White, M.F. & Kahn, C.R. 1994, "The insulin signaling system", *J Biol Chem*, vol. 269, no. 1, pp. 1-4.

Wientzek, A., Diaz, M.J., Castano, J.M., Amiano, P., Arriola, L., Overvad, K., Ostergaard, J.N., Charles, M.A., Fagherazzi, G., Palli, D., Bendinelli, B., Skeie, G., Borch, K.B., Wendel-Vos, W., de Hollander, E., May, A.M., den Ouden, M.E., Trichopoulou, A., Valanou, E., Soderberg, S., Franks, P.W., Brage, S., Vigl, M., Boeing, H. & Ekelund, U. 2013, "Cross-sectional associations of objectively measured physical activity, cardiorespiratory fitness and anthropometry in European adults", *Obesity*, [Epub ahead of print].

Willis, D., Mason, H., Gilling-Smith, C. & Franks, S. 1996, "Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human

granulosa cells of normal and polycystic ovaries", *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 81, no. 1, pp. 302-309.

Woods, D.C., Telfer, E.E. & Tilly, J.L. 2012, "Oocyte family trees: old branches or new stems?", *PLoS Genet*, vol. 8, no. 7, pp. e1002848.

Wu, S., Divall, S., Wondisford, F. & Wolfe, A. 2012, "Reproductive tissues maintain insulin sensitivity in diet-induced obesity", *Diabetes*, vol. 61, no. 1, pp. 114-123.

Yadav, A., Kataria, M.A., Saini, V. & Yadav, A. 2013, "Role of leptin and adiponectin in insulin resistance". *Clin Chim Acta*, vol 417, n°. 1, pp. 80-84.

Yu, W.H., Kimura, M., Walczewska, A., Karanth, S. & McCann, S.M. 1997, "Role of leptin in hypothalamic-pituitary function", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 3, pp. 1023-1028.

IX. ABREVIATURAS:

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ANOVA: Test de Análisis de la Varianza.
- ASEBIR: Asociación Española para el estudio de la biología reproductiva.
- ATPIII: Adult Treatment panel III.
- CA: Circunferencia abdominal.
- ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
- EMM: Edad media de la maternidad.
- EOC: Estimulación ovárica controlada.
- ESHRE: Sociedad europea de reproducción humana y embriología.
- E₂: Estradiol.
- FIV: Fecundación “in vitro”.
- FSH: Hormona foliculoestimulante.
- FSHr: Hormona foliculoestimulante recombinante.
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina.
- HCG: Gonadotropina corionica humana.
- HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana.
- HOMA-IR: Modelo homeostático de valoración para la resistencia a insulina.
- HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias.
- ICSI: Inyección intracitoplasmática del espermatozoide.
- IFC: Indicador coyuntural de fecundidad.
- IGF-I: Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I.
- IGF-II: Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II.
- IGF1-R: Receptor del Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1.
- IGFbps: Proteínas de unión de los IGF a su receptor.

- IMC: Índice de Masa Corporal.
- IR: Receptor de insulina.
- IRS 1: Substrato tipo 1 del receptor de insulina.
- IRS 2: Substrato tipo 2 del receptor de insulina.
- IRR: Receptor relacionado con el receptor de insulina.
- LH: Hormona luteinizante.
- OMS: Organización mundial de la salud.
- PRO: Pobre respuesta ovárica.
- PTP1B: Protein tyrosin fosfatasa 1B.
- P₄ :Progesterona.
- QUICKI: Quantitative insulin sensitivity check index.
- RI: Resistencia a la insulina.
- ROC: Característica Operativa del receptor (Receiver Operating Characteristic).
- SHBG: Globulina transportadora de las hormonas sexuales
- SNC: Sistema nervioso central
- SOP: Síndrome del ovario poliquístico.
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alpha.
- TRA: Técnicas de reproducción asistida.
- UI/d: Unidades internacionales / día.
- VDRL: Test treponémico para el diagnóstico de sífilis. (Venereal disease research laboratory).