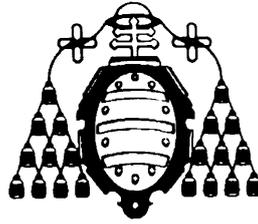


UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Influencia de la obesidad en las técnicas de reproducción asistida

Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción

Alumno: David Llaneza Suárez
Tutor: Dr. Abel Gayo Lana
Junio del 2012

ABEL GAYO LANA, Doctor en Biología por la Universidad de OVIEDO, Embriólogo en el laboratorio de Fecundación In Vitro de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del HUCA.

CERTIFICA:

Que el Trabajo presentado por D. DAVID LLANEZA SUÁREZ, titulado “INFLUENCIA DE LA OBESIDAD EN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA”, realizado bajo la dirección de la Dr. Abel Gayo Lana, dentro del programa de Master en “Biología y Tecnología de la Reproducción”, reúne a su juicio las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Master.

Para que así conste dónde convenga, firma la presente certificación en Oviedo a 11 de JUNIO de 2012.

VºBº



Fdo. Abel Gayo Lana.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no podría haberse realizado sin los conocimientos adquiridos en el presente Máster, aportándome todas sus asignaturas las nociones necesarias para llevar a cabo este estudio.

En primer lugar deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Abel Gayo Lana por la confianza deposita en mí y acceder a ser mi tutor del trabajo, por haberme enseñado a investigar y por sus horas de dedicación, guiándome y mostrando en cada momento una inmejorable disposición ante las dudas que durante la realización del mismo me surgieron y al Profesor Dr. Ángel Plácido Llana Coto por sus orientaciones, sugerencias, consejos y valiosas aportaciones que guiaron en todo momento la investigación.

Me gustaría agradecer al Dr. Ignacio Arnott Fernández, a la Dra. Lourdes Sánchez Castro y a Vanesa Castañón Bernardo por brindarme la oportunidad de colaborar con ellos y a todo el personal de la unidad FIV del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) por haberme tratado como un compañero más.

También dar las gracias al equipo del Centro de Reproducción Asistida de Quirón Bilbao por permitirme realizar las prácticas en esta unidad, aprendiendo así el funcionamiento de diversas unidades en este campo.

Y, por supuesto a mis familiares y amigos por su cariño, ayuda, comprensión, y como no, por haberme apoyado siempre y a pesar de todo.

ÍNDICE:

➤ Introducción.....	5
○ Aumento ponderal y composición corporal a lo largo de la vida de la mujer.....	6
○ Influencia del sobrepeso y la obesidad en el proceso reproductivo.....	7
○ Mecanismos de acción que explican de un modo plausible los peores resultados en mujeres con incremento de IMC.....	9
▪ Cambios hormonales.....	9
▪ Cambios en leptina.....	10
▪ Cambios en la homeostasis de la glucosa. Resistencia a la Insulina.....	12
▪ Cambios en la respuesta a la inducción de la ovulación.....	16
▪ Disfunciones endometriales y tubáricas.....	18
➤ Hipótesis y objetivos.....	20
➤ Material y métodos.....	21
➤ Resultados	24
➤ Discusión.....	30
➤ Conclusiones.....	33
➤ Bibliografía.....	34

I. INTRODUCCIÓN

El exceso de peso o masa corporal (sobrepeso y obesidad) es un problema de salud que alcanza cuotas preocupantes en los países industrializados. Se estima que entre el 30 y 50% de los hombres y mujeres en edad reproductiva se encuentran en sobrepeso o son obesos, sobre todo en los países desarrollados. En Europa, se calcula que más de la mitad de la población tiene sobrepeso (índice de masa corporal [IMC] ≥ 25 -30 kg/m²) y casi un tercio es obesa (IMC ≥ 30 kg/m²)¹. En España, la prevalencia de obesidad para las mujeres entre 25 y 64 años se sitúa en un 17,5%, con tasas más elevadas en las regiones del Noroeste peninsular, Murcia, Andalucía y Canarias². Según la última Encuesta Europea de Salud, publicada por el Instituto Nacional de Estadística en el año 2010, los problemas de sobrepeso y obesidad en nuestro país aumentan con la edad de la mujer, especialmente en las mujeres con un nivel más bajo de instrucción (Figura 1)

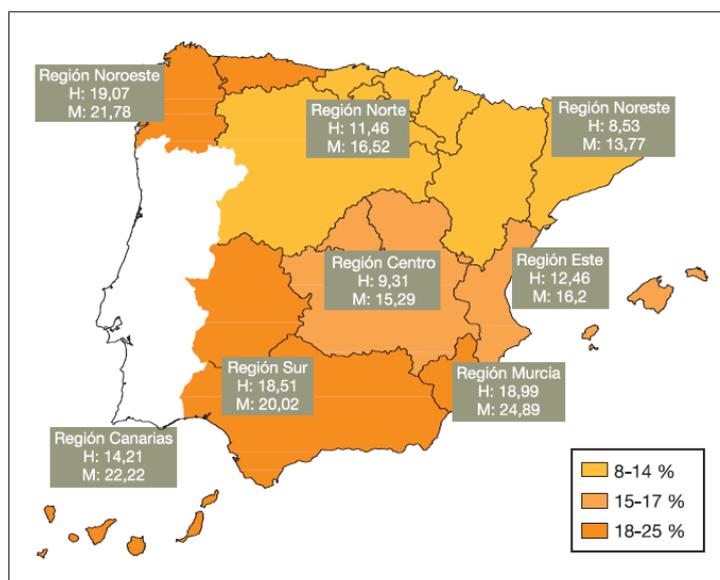


Figura 1. Distribución de la prevalencia de obesidad (%) por áreas geográficas y sexo. Estudio DORICA.

Un IMC elevado se asocia con un incremento de la morbilidad y la mortalidad, de manera que existen pruebas de un aumento de las enfermedades cardiovasculares, diabetes, cierto tipo de cánceres y de diversos problemas ortopédicos. Por otro lado, aunque el riesgo de sobrepeso y de obesidad aumenta con la edad, datos epidemiológicos muestran un incremento de su frecuencia en niños y jóvenes adultos³.

Estos datos epidemiológicos unidos al retraso del momento en que se planifica la gestación en las mujeres de los países occidentales hacen que cada día sea mayor el número de mujeres con IMC elevado que buscan ayuda para conseguir cumplir sus deseos reproductivos.

El aumento de peso se asocia con una reducción de la fertilidad tanto en hombres como en mujeres y además, se ha asociado también con un incremento en los costes de las técnicas de reproducción asistida (TRA) ya que en los tratamientos suelen requerirse dosis más elevadas de gonadotropinas, presentan peor respuesta folicular y una mayor tasa de abortos⁴.

II. AUMENTO PONDERAL Y COMPOSICIÓN CORPORAL A LO LARGO DE LA VIDA EN LA MUJER

El peso excesivo suele tener una etiología multifactorial que incluye la ingesta excesiva de calorías, estilo de vida sedentario, susceptibilidad genética, factores hormonales, costumbres culturales y étnicas, formas de alimentarse, cambios psicológicos, y enfermedades psiquiátricas⁵.

A lo largo de la vida de la mujer, los cambios hormonales pueden causar un incremento del peso dada la influencia de los estrógenos sobre la regulación del apetito, el gasto de energía y el metabolismo en los tejidos⁶. En etapas de la vida de la mujer como la adolescencia, la gestación o la transición menopáusica las variaciones hormonales son tan importantes que pueden influir sobre el IMC (Figura 2).

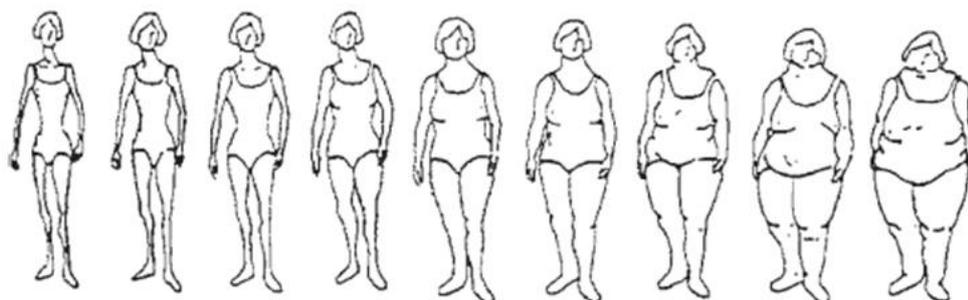


Fig 2.- Pictograma representado la distribución corporal a lo largo de la vida de la mujer. (Tomado del Nurses Health Study).

La obesidad en muchachas durante la peripubertad podría asociarse con hiperandrogenemia y riesgo elevado de desarrollar un síndrome de ovario poliquístico (SOP) durante la adolescencia que acabaría desarrollando una resistencia a la insulina y una hiperinsulinemia compensatoria con las diversas patologías acompañantes a corto y largo plazo ⁷.

En las mujeres la fertilidad declina de manera progresiva con la edad debido a la depleción de la reserva folicular ovárica y la peor calidad de los oocitos. De hecho en muchas mujeres, los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA) se opta por la edad de 35 años para comparar los resultados⁸. A medida que el funcionamiento del ovario no es tan preciso como en años anteriores, se asiste a una disminución de los niveles circulantes de estradiol y con el incremento de hormona folículo-estimulante (FSH) que puede asociarse a un aumento del tejido adiposo ya que los estrógenos influyen en la actividad de la lipoprotein-lipasa aumentando la lipólisis⁹ y se han considerado como predictores de obesidad el aumento del índice de andrógenos libres (IAL) y la disminución de la proteína de transporte de hormonas sexuales (SHBG)¹⁰.

III. INFLUENCIA DEL SOBREPESO Y LA OBESIDAD EN EL PROCESO REPRODUCTIVO.

Cuando el sobrepeso o la obesidad está presente durante los años reproductivos, plantea diversos problemas en la pareja y la falta de éxito de muchas de las dietas y programas de tratamiento para reducir el peso muestran la dificultad de lograr un peso adecuado, de manera que limitarse a aconsejar a las pacientes obesas que adelgacen porque la obesidad podría afectar a la fertilidad, puede añadir más presión y estrés lo que aumentaría aún más las dificultades para el éxito reproductivo.

El tejido adiposo es considerado en la actualidad como el mayor órgano endocrino del cuerpo humano, con efectos en la homeostasis de la glucosa, la producción de esteroides, el sistema inmune, la hematopoiesis y la función reproductiva. Su posibilidad de convertir andrógenos a estrógenos debido a la presencia de la P450 aromataasa es sólo un ejemplo de su impacto en la reproducción; además, el tejido adiposo incrementa la resistencia a la insulina que conducirá a un hiperandrogenismo y

a un desorden de la ovulación en las mujeres y a cambios en los parámetros del espermiograma en los hombres. Finalmente, el descubrimiento de las adipokinas y el mejor conocimiento de sus papeles fisiológicos justifican el papel que juega el tejido graso en la reproducción¹¹.

En los hombres la obesidad se ha considerado responsable de un descenso en la concentración y motilidad de los espermatozoides, así como de un aumento en el daño del DNA, lo que hace que las posibilidades de ser padre se reduzcan en los hombres con valores altos de IMC, habiéndose propuesto, entre otros, un posible papel del estrés oxidativo del esperma a través de una elevada actividad de los macrófagos seminales como posible causa de estos cambios. Un estudio reciente en este campo concluye que en los hombres con IMC elevado se ha observado un menor recuento de espermatozoides, niveles más bajos de testosterona e incremento en los niveles séricos de estradiol como posibles causas de fracaso reproductivo¹².

En las mujeres, el aumento de IMC se asocia con una mayor probabilidad problemas menstruales y anovulación crónica que puede afectar al endometrio incrementando el riesgo de hiperplasia endometrial y de cáncer de endometrio¹³; por otro lado, los diversos problemas médicos que se pueden asociar al sobrepeso y la obesidad reducen las posibilidades de conseguir su deseo reproductivo en estas mujeres, de manera que la obesidad influye de forma negativa en todo el proceso reproductivo con una mayor incidencia de infertilidad, menor probabilidad de éxito en las técnicas de reproducción asistida (TAR) y, en caso de lograr una gestación, con mayor incidencia de complicaciones durante el embarazo¹⁴.

Diferentes mecanismos han sido implicados para explicar los peores resultados reproductivos en las pacientes con sobrepeso u obesidad: resistencia a la insulina, hiperandrogenismo, niveles elevados de leptina, resistina y grelina que podrían afectar al crecimiento del folículo, la función del cuerpo lúteo, el desarrollo embrionario temprano, la función del trofoblasto o la receptividad endometrial

IV. MECANISMOS DE ACCIÓN QUE EXPLICAN DE UN MODO PLAUSIBLE LOS PEORES RESULTADOS REPRODUCTIVOS EN MUJERES CON INCREMENTO DEL IMC .

IV.1. CAMBIOS HORMONALES

La obesidad se asocia con cambios importantes en la función endocrina a diversos niveles. La hipersinsulinemia y la resistencia a la insulina son los cambios más conocidos, aunque su mecanismo y significancia clínica no han sido claramente establecido. Se conoce también que en las personas obesas hay una disminución de la secreción de la hormona somatotropa (GH) que es funcional y puede ser revertida en algunas circunstancias, tampoco se conoce en profundidad el mecanismo fisiopatológico responsable de los bajos niveles de GH aunque parece obedecer a un mecanismo multifactorial que podría incluir a la somatostatina, los ácidos grasos libres y la grelina.¹⁵

Las mujeres con $IMC > 25$ presentan niveles más bajos de excreción de gonadotrofina y en la fase lútea tienen también niveles de metabolitos de la progesterona más bajos, lo que implica que la obesidad tiene un efecto negativo sobre las funciones del cuerpo lúteo.

En las mujeres, la obesidad abdominal se asocia con niveles más altos de andrógenos y hoy se conoce que la testosterona parece tener un efecto bifásico en la producción de gonadotrofinas en las mujeres. Elevaciones moderadas de testosterona parecen estimular la producción de LH tanto a nivel hipotalámico como hipofisario, pero los niveles altos de testosterona suprimen la secreción de LH. Más compleja es la situación que ocurre en el SOP en donde se asiste a una situación hiperandrogenismo hipergonadotrópico asociado a la obesidad ya que en esta situación el hiperandrogenismo ovárico y el exceso de adiposidad, parecen compartir un origen común determinado por la hiperinsulinemia secundaria a la resistencia a la insulina¹⁶.

Las mujeres obesas suele tener también niveles séricos más bajos de globulina transportadora de las hormonas sexuales (SHBG) y algunos trabajos han encontrado que dicha globulina se correlaciona de forma negativa con el IMC, la circunferencia abdominal, la glucemia en ayunas y posprandial así como con la insulina y el HOMA-IR y el índice de andrógenos libre¹⁷.

Finalmente, una moderada elevación de las concentraciones de TSH asociada con valores de triyodotironina (T3) ligeramente por encima del rango de la normalidad, suele observarse con frecuencia en las personas obesas. Esas alteraciones parecen más una consecuencia que una causa de la obesidad ya que la pérdida de peso lleva a una normalización de dichas hormonas, aunque la causa última de estos cambios se desconoce, si bien se ha sugerido un posible papel de la leptina ya que sus concentraciones séricas influyen en la liberación de TSH¹⁸

IV.2. CAMBIOS EN LEPTINA

El tejido adiposo que antiguamente se consideraba como un órgano estático con funciones de almacenamiento de grasas, se ve hoy en día como un tejido especializado en constante renovación con funciones endocrinas y paracrinas. Al igual que en el hueso, los adipocitos sufren un proceso constante de “turn over” y son capaces de producir factores especializados denominados adipokinas con acciones en diversos órganos y cuyas funciones últimas aún no se comprenden con exactitud. Entre estas adipokinas, merecen especial interés la leptina y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que modulan varias funciones biológicas y juegan un importante papel en la regulación metabólica y de la biología vascular¹⁹.

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. Además de en los adipocitos, se ha observado que otros tejidos como el estómago, el músculo esquelético, el hígado o la placenta pueden también producirla. La leptina es segregada de forma directamente proporcional a la cantidad de grasa corporal y sus niveles sanguíneos sirven como indicador de la cantidad de energía acumulada en el cuerpo, siendo fundamental en el proceso de la regulación de la homeostasis de la energía, de manera que las personas con un déficit congénito de leptina son obesas y el tratamiento con leptina conduce a una pérdida de peso a través de una disminución de la ingesta de calorías y posiblemente también por un incremento en el gasto de energía. Estudios recientes indican que la leptina parece jugar un papel fisiológico más importante como mecanismo indicador de déficit de energía que como indicador de exceso de energía. Este importante papel fisiológico de indicador de déficit de energía

puede conducir al organismo a aumentar la ingesta de calorías y alterar las funciones neuroendocrinas para evitar el gasto energético, tales como inducir cambios en el eje hipotálamo-pituitario-gonadal que conduzcan a un hipogonadismo para prevenir la fertilización, lo que parece estar de acuerdo con los hallazgos encontrados en pacientes que realizan dietas severas o ejercicio excesivo que conduce a una amenorrea hipotalámica y lipoatrofia junto a deficiencia de leptina, situación que puede ser revertida cuando se restauran los valores de leptina a sus niveles fisiológicos²⁰.

Muchos pacientes obesos desarrollan una resistencia a la leptina, de forma que pueden comportarse como en las situaciones anteriormente descritas a pesar de tener niveles elevados de leptina²¹. En la obesidad, la respuesta anorética a la leptina está disminuida debido a una atenuación de la señalización de la leptina a nivel celular que ha sido asociada a un incremento en la expresión de la protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), existiendo trabajos que han identificado en ratones niveles críticos hipotalámicos de tyrosine phosphatase (TCPTP) a partir de los cuales se desarrolla la resistencia a la leptina.²² También han sido mutaciones espontáneas en genes relacionados con el receptor de la leptina (ObR) que han sido relacionadas con la resistencia a la leptina y con la obesidad²³.

A pesar de que la leptina tiene una acción estimulante sobre la GnRh, la FSH y la LH, tal como comentamos más arriba, niveles elevados de leptina pueden inhibir la esteroidogénesis inducida por la insulina en las células de la granulosa y de la teca en los animales, lo que podría explicar parcialmente los pobres resultados de fertilidad observados en las pacientes obesas²⁴ y también se ha observado en estudios “in vitro” sobre células de la granulosa, han observado un papel negativo de la leptina en la función ovárica²⁵. Un estudio reciente “in vitro” en células de la granulosa humana muestran un efecto de la leptina sobre la secreción de estradiol basal y de progesterona de un modo dosis dependiente, de manera que a bajas concentraciones la leptina estimula la secreción de estradiol y progesterona, mientras que a dosis más altas suprime la secreción de ambos esteroides²⁵.

Por otro lado, la leptina puede afectar a la homeostasis tímica y a la secreción de reactantes de fase aguda como la interleuquina-1 o el TNF- α ; además, se ha visto que la leptina puede promover la diferenciación de T helper 1(Th1) y modular el inicio y progresión de la respuesta autoinmune en varios modelos animales de enfermedad²⁶. En definitiva, parecen existir diversas vías por las que las adipocinas y, en concreto, la

leptina pueden influir en el proceso reproductivo, siendo fundamentales para la mantener la integridad del eje hipotálamo-pituitario-gonadal, para regular el proceso ovulatorio y para conseguir una implantación embrionaria adecuada²⁷ (Figura 3)

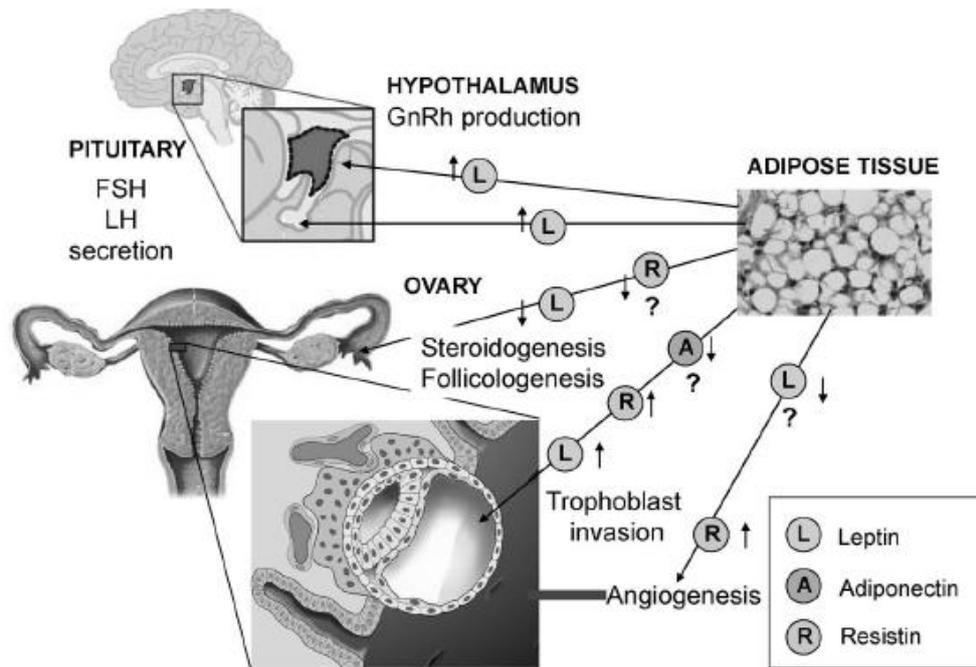


Fig.3 Acciones conocidas de las adipocinas sobre la fertilidad humana

IV.3. CAMBIOS EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA. RESISTENCIA A LA INSULINA

Además del efecto en la homeostasis de la energía periférica, la insulina tiene también un importante papel en la función ovárica, de modo que la resistencia a la insulina en el ovario podría contribuir a un deterioro de la función reproductiva en la mujer obesa.

La señalización intracelular de la insulina comienza cuando se activa su receptor que ocasiona la fosforilización de diversos substratos, entre los que se incluye el subtraro receptor de insulina (IRS) que es una proteína que se une y activa al enzima phophaidilinositol-3-kinasa (PI3K). La ruta PI3K/AKT juega un importante papel en el efecto metabólico de la insulina. AKT también fosforiliza e inactiva a miembros de la familia FOXO y en la glicogeno sintetasa kinasa 3B (GSK3B).

Varios trabajos han señalado la posibilidad de que la insulina estimule la estereoidogénesis en el ovario, al menos en células in vitro y la presencia del receptor de insulina en el estroma y el folículo ovárico, indican que el ovario es un organo diana en la acción de la insulina; de hecho, la señalización de la insulina juega un papel en la función ovárica influyendo en la regulación de la esteroidogénesis ovárica, el desarrollo folicular y la proliferación celular de la granulosa.

La resistencia a la insulina juega un papel central tanto en el síndrome metabólico como en el SOP (Figura 4 y tabla I)²⁸ y una unión entre ambas condiciones se ha observado en diversos estudios con la presencia de síndrome metabólico en el 33%-46% de las mujeres con SOP²⁹

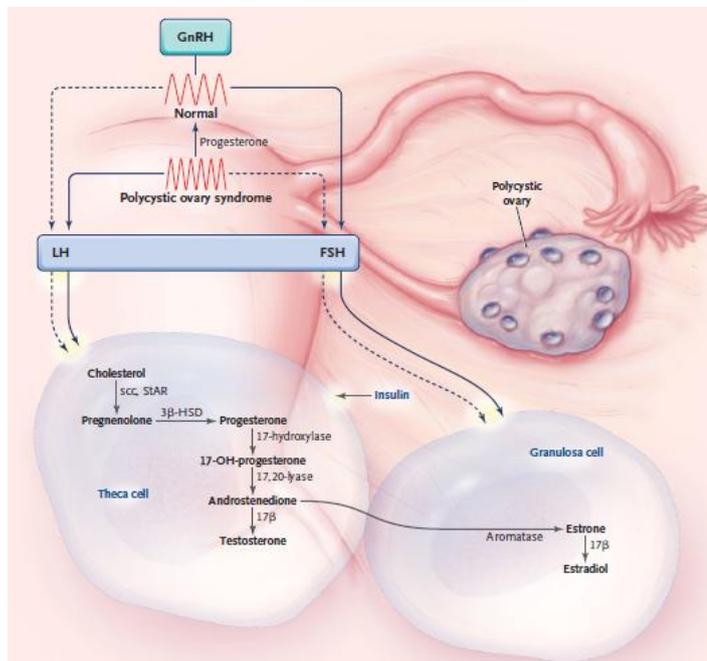


Fig 4 Eje hipotálamo-pituitario-ovárico y acción de la insulina en el SOP.

Tabla 1

	Prevalence	Effect on fertility	Metabolic syndrome	Mechanism	Potential therapy
PCOS	5-8% Women of reproductive age	Anovulation	30-75% obese, 30-40% impaired glucose tolerance	1. ?Hyperinsulinemia 2. Hyperandrogenism leading to amenorrhea/infertility	1. Weight loss/exercise 2. Insulin sensitizers 3. ART
Obesity	25% of women in the USA	Anovulation; BMI >30 leads to 3 × the risk of infertility compared with BMI <24	Insulin resistance, risk factor for diabetes and CVD	1. ?Insulin resistance/insulin excess 2. Hyperandrogenism lead to amenorrhea/infertility	1. Weight loss/exercise 2. ? Bariatric surgery

ART, Assisted reproductive technology; CVD, cardiovascular disease.

Implicaciones del SOP y de la obesidad en la disfunción reproductiva. (Tomado de Cardozo E et al³⁰)

Los primeros datos sobre el papel de la leptina en el desarrollo de la resistencia a la insulina vienen de los datos observados en animales en los que hay ausencia de esta hormona. En esta línea, los ratones con una mutación en el gen ob/ob que causa ausencia de leptina, produce hiperfagia, obesidad, el desarrollo de resistencia a la insulina y otros desordenes endocrinos³¹. Además, la hiperleptinemia asociada con la obesidad es considerada actualmente como un importante factor en el desarrollo de la diabetes tipo 2, de forma que se piensa que el deterioro en la sensibilidad a la insulina podría ser el “primum movens” de el establecimiento de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 y por otro lado, los niveles plasmáticos de leptina pueden servir como un marcador endógeno de la sensibilidad a la acción de la insulina¹⁷ (Figura 5).

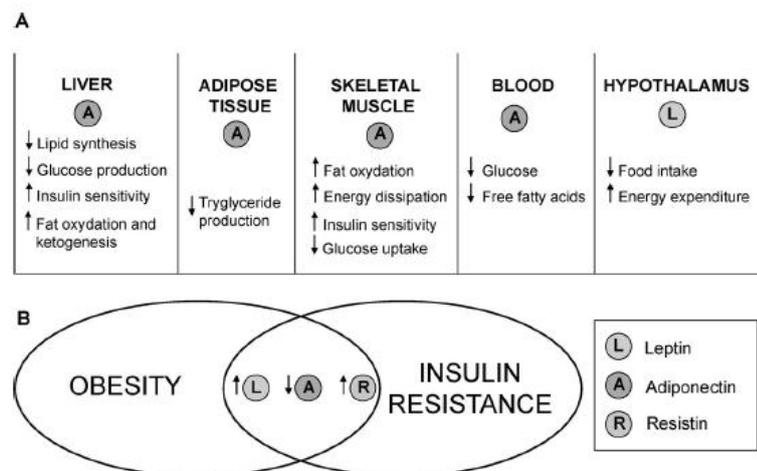


Fig 5 Acciones de las adipokinas sobre los tejidos periféricos y modificaciones asociadas con la obesidad y la resistencia a la insulina

En la obesidad, la expansión del tejido adiposo se asocia con el aumento de la inflamación del mismo, y existen indicios de que esta inflamación es una relación causal entre la resistencia a la insulina (IR) y otras afecciones relacionadas con la obesidad. La contribución del tejido adiposo visceral a las alteraciones metabólicas es mayor que la del tejido adiposo subcutáneo. La obesidad está unida a una endocrinopatía muy común en la mujer que se caracteriza por oligomenorrea o anovulación, hiperandrogenismo y ovarios poliquísticos observados por ecografía y al que se conoce como SOP³². Este síndrome afecta al 5-10% de las mujeres en edad reproductiva y se asocia frecuentemente con resistencia a la insulina con una hiperinsulinemia compensatoria. Se calcula que entre el 16-80% de las mujeres con SOP son obesas. Tanto en las mujeres obesas como en las delgadas con SOP y resistencia a la insulina a las que se administra agentes sensibilizantes de la insulina, como por ejemplo la metformina, puede incrementarse la sensibilidad a la insulina y conseguir ovulaciones.

El mecanismo por el que se consigue ovulación en las mujeres con SOP en las que se regula la resistencia a la insulina ha sido estudiado de forma que se conoce que en los adipocitos de las mujeres amenorréicas con SOP hay una disminución del número de receptores de insulina y un severo deterioro de la acción de la insulina, existiendo también una reducción de la tasa de máxima captación de glucosa del adipocito que es secundario a un descenso significativo en las proteínas transportadoras de glucosa GLUT4³³. Estos resultados sugieren que la resistencia a la insulina en el SOP podría representar las consecuencias del defecto en la señal de transducción.

Algunos estudios han propuesto una posible relación entre adipokinas y las anomalías metabólicas y reproductivas en el SOP debido a que una proporción importante de mujeres con SOP presentan valores más elevados de leptina de lo que cabría esperar por su IMC³⁴, aunque otros trabajos no han confirmado esas observaciones³⁵. Un estudio más reciente, observó que los niveles séricos de leptina en el SOP eran más altos que en el grupo control, independientemente del IMC y que había una relación positiva entre la leptina y la insulina inmuno-reactiva y entre la leptina y el HOMA-IR, siendo esta última relación independiente del IMC, la circunferencia abdominal o la relación cintura-cadera.³⁶, de manera que parece que la correlación entre los niveles séricos de leptina y los índices hormonales de resistencia a la insulina, sugiere que la hiperleptinemia podría ser debido a una resistencia a la leptina que sería característica del SOP.

IV.4 CAMBIOS EN LA RESPUESTA A LA INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN

Se han comunicado peores respuestas a la inducción de la ovulación, siendo necesario el empleo de dosis más elevadas de gonadotrofinas en las mujeres en sobrepeso u obesas³⁷. Además en estas mujeres se obtiene una menor tasa de oocitos y tienen tasas más bajas de fertilización y superovulación³⁸.

El estudio de leptina en el líquido folicular de 20 pacientes con SOP sometidas a fecundación in vitro mostró que la tasa de leptina en líquido folicular respecto a la leptina plasmática estaba asociada de forma independiente con el IR y que parecía asociarse con las dosis acumulativas de FSH, concluyendo los autores que en las mujeres con SOP la obesidad podría influir en la elevación de la leptina en el líquido folicular originando una relativa resistencia a la estimulación de las gonadotrofinas³⁹

Se conoce que la leptina sérica actúa en varios niveles el eje hormonal de la reproducción con acciones estimulantes a nivel del hipotálamo y la hipófisis e inhibitoras a nivel gonadal⁴⁰. Sólo se conoce en parte el efecto intraovárico de la leptina, habiéndose señalado un posible papel antagonista del IGF-I que alteraría la estereoidogénesis en las células de la granulosa y de la teca⁴¹, aunque se piensa que el efecto intraovárico de la leptina puede ser aún más profundo a causa de la baja actividad ligada a leptina en el folículo preovulatorio de las mujeres obesas. Parece existir una relación positiva entre la leptina en líquido folicular y el IMC y negativa con el número de oocitos conseguidos y con los niveles de estradiol en pacientes sometidas a FIV⁴². Sin embargo, en un reciente estudio se encontró que los niveles séricos e intrafoliculares de leptina no se correlacionaban con los resultados de la FIV⁴³. En otros trabajos que estudian el papel de los niveles intrafoliculares de insulina, leptina y adiponectina, sí se encuentra un posible papel de estas hormonas en el desarrollo folicular que podría afectar al proceso reproductivo, al menos en pacientes con SOP⁴⁴ y también se comunicó que los niveles de leptina en el líquido folicular son un mejor predictor del éxito de fertilización del oocito que el diámetro folicular⁴⁵.

Los niveles de TNF- α y otras citoquinas proinflamatorias parecen también estar aumentados en suero y en líquido folicular en las mujeres obesas y con resistencia a la

insulina que se someten a técnicas de reproducción asistida (TRA). El papel que juegan no se conoce tampoco bien en el momento actual⁴⁶, si bien estudios en animales han encontrado receptores para TNF- α en células de la teca y de la granulosa y parece que dicho factor de crecimiento es capaz de inhibir la producción de progesterona y 17beta-estradiol en las células de la granulosa⁴⁷.

La pleiotrofina (PTN) es otra citoquina que pertenece a la nueva familia de factores de crecimiento de unión a heparina. Aunque la expresión de PTN disminuye tras el nacimiento, se ha observado que el mRNA de PTN está presente en tejidos del adulto y se ha propuesto que podría estar implicada en el control de la adipogénesis, pudiendo tener un papel los procesos inflamatorios asociados a la obesidad⁴⁸. Aislada en el líquido folicular de bovinos, parece jugar un papel en el desarrollo y maduración in vitro de los oocitos⁴⁹. En humanos no ha sido estudiado si sus concentraciones intrafolículo se relacionan o no con la obesidad.

Todos estos cambios a nivel de las citoquinas podrían explicar la peor respuesta a la inducción de la ovulación en la mujer obesa. Por otra parte, se ha comunicado también una relación entre la obesidad y la reserva ovárica de manera que la hormona antimulleriana (AMH) y la inhibina B séricas que son consideradas en la actualidad buenos predictores de la reserva ovárica, pudieran presentar niveles séricos diferente en mujeres con IMC elevado. Así, algunos estudios han encontrado que durante los últimos años reproductivos, se observan valores más bajos de AMH en las mujeres obesas, si bien el recuento de folículos antrales no es diferente, lo que sugiere un posible papel fisiológico de control de estas hormona distinto de la reserva ovárica en las mujeres obesas⁵⁰.

Finalmente, cuando se realiza la estimulación ovárica en las técnicas de reproducción asistida no sólo se obtienen menos oocitos en las mujeres obesas, sino que son también más pobres las tasas de fertilización y la calidad del embrión. Algunos estudios han correlacionado la resistencia a la insulina con una peor calidad del oocito⁵¹.

Se han propuestos diversos mecanismos para explicar la peor calidad del oocito observada en las mujeres obesas. Algunos estudios han sugerido un ambiente metabólico alterado en la madre podría llevar a un microambiente folicular anormal que conduciría a una peor calidad embrionaria. De esta forma, se han observado en mujeres obesas niveles más elevados de insulina, lactato, triglicéridos y proteína C reactiva, junto

con niveles más bajos de SHBG⁵². Algunos de estos cambios, como el nivel elevado de proteína C reactiva, podría estar traduciendo un proceso inflamatorio y un incremento del estrés oxidativo, común en las mujeres obesas, que ha sido relacionado con una disminución del potencial de desarrollo del oocito⁵³.

IV.5 DISFUNCIONES ENDOMETRIALES Y TUBÁRICAS

Se ha descrito una mayor incidencia de problemas tubáricos y endometriales asociados con niveles altos de IMC, por ello algunos trabajos han focalizado el problema en el endometrio mientras que otros han dirigido su atención hacia el papel del ovario, siendo el modelo para estudiar el papel de ambos, el modelo de donación de oocitos.

En un amplio estudio de 712 ciclos en pacientes que conseguían embarazos mediante técnica de donación de oocitos. Se utilizó este modelo para descartar posibles variables de confusión como la edad de la madre o la calidad del oocito, y se observó una tendencia hacia tasas más bajas de implantación y tasas de abortos significativamente más altas en las mujeres obesas que en las normales o con sobrepeso⁵⁴. Sin embargo, los mismos autores en un trabajo posterior en el consideraban 2656 ciclos de donación de oocitos encontrabas cifras similares de tasas de implantación, embarazo y abortos en los distintos grupos de IMC en que habían dividido a sus pacientes, de modo que el papel del endometrio si existe parece sutil⁵⁵ y probablemente asociada a la alteración de algunos genes relacionados con la ventana de implantación⁵⁶. En otro estudio en el que se incluían 2656 ciclos de donación de primer óvulo con buena calidad embrionaria en mujeres jóvenes con IMC normal en las que se usó IVF/ICSI, se observó que a medida que aumentaba el IMC había una disminución significativa de la tasa de implantación y de la tasa de embarazo⁵⁵. Ambos estudios concluyen que la obesidad tiene un efecto negativo en el endometrio independientemente de su efecto en la calidad del oocito.

La implantación embrionaria es un proceso complejo durante el cual el blastocisto se adhiere al endometrio y se mueve hacia el estroma decidual invadiendo la vascularización materna. La capacidad invasiva del trofoblasto extraembrionario está regulado por una variedad de proteínas y es promovida por algunos enzimas como las

metaloproteinasas de matriz (MMPs). Por otro lado, una implantación correcta requerirá de un proceso angiogénico placentario adecuado para lo que son precisos diversos factores angiogénicos identificados en la “interface” feto-materna como el MMP-2 o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y en los últimos años se ha comunicado un posible papel de las adipokina en el crítico proceso de invasión trofoblástica y de la angiogénesis placentaria. La leptina se segrega en el trofoblasto y puede incrementar de manera dosis-dependiente la secreción de MMP-2 y fibronectina fetal⁵⁷. Se podrían explicar así, el incremento de abortos precoces encontrado por algunos autores⁵⁸.

HIPÓTESIS

El sobrepeso y la obesidad se asocian con un estado inflamatorio que puede afectar a la reproducción por acciones en diversos niveles del eje reproductivo. Las variaciones de los niveles en el suero y en el líquido intrafolicular de algunas adipocitoquinas pueden ser las responsables de los peores resultados obtenidos con las técnicas de reproducción y asociarse con una senescencia ovárica más acelerada.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

- **OBJETIVO PRINCIPAL:**

El objetivo principal de nuestro estudio será comprobar la relación entre el IMC de pacientes que se someten a las técnicas de TRA. Los resultados obtenidos serán utilizados como base para un posible proyecto de investigación.

- **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- 1) Comprobar el diseño experimental y analizar y corregir los posibles defectos en su funcionamiento.

- 2) Comprobar con los datos obtenidos que el cálculo del tamaño de la muestra que nos permita obtener un poder estadísticos suficiente para testar la hipótesis que planteamos en un futuro proyecto de investigación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRA

Estará compuesta por pacientes que acuden a la consulta de FIV del HUCA para someterse a TRA que cumplan los siguientes criterios de inclusión:

2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Trastorno de la fertilidad que precise de TRA.
- Conformidad para participar en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado.
- Edad entre 30 y 40 años
- Ausencia de enfermedad oncológica
- Ausencia de diabetes mellitus

3. CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Si en el presente estudio piloto se confirma que los datos sobre obesidad presentes en nuestro medio son similares a los comunicados en la literatura y nuestros resultados en TRA también se ajustan a los mismos, pensamos que para conseguir una potencia del 80% para detectar diferencias para análisis de varianza usando un nivel de significación de 0.05 que un tamaño muestral de 168 ciclos (84 en pacientes con normopeso) y 84 (en pacientes con sobrepeso u obesidad), asumiendo un valor medio de leptina en plasma de 25.0 ng/dL (DE \pm 7.06)⁵⁹ y una diferencia igual a media desviación estándar.

4. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, prospectivo y abierto de casos y controles

5. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

Las pacientes que hayan firmado el consentimiento informado para participar en el estudio serán evaluadas mediante la historia clínica y la exploración física en la que se realizará la toma de medidas antropométricas para la obtención del IMC, la circunferencia abdominal. De acuerdo con los valores de IMC las pacientes serán distribuidas en dos grupos:

- a) Grupo control (GC) compuesto por mujeres con $IMC < 25$ (delgadas y en normopeso)
- b) Grupo estudio (GE) compuesto por mujeres con $IMC \geq 25$ (sobrepeso y obesas)

Tras el estudio clínico de rutina previo a su inclusión en el programa de estimulación ovárica, las pacientes serán sometidas al mismo tratamiento de estimulación ovárica, según el protocolo de la Unidad de FIV.

Se realizará una ecografía transvaginal para control del número y tamaño de los folículos. La punción de los ovarios se realizará con sonda ecografica transvaginal tras desencadenar la ovulación 36 horas antes con hCG, se medirá el diámetro folicular, número de folículos, calidad del embrión (estudiando la morfología embrionaria a las 42-72 horas y tomando en consideración el número de blastómeras y el porcentaje de fragmentación). El embarazo bioquímico (considerándolo cuando existía un test de gestación positivo por medio de un Kit comercial que valorará la β -hCG), las tasas de implantación (valorada después de 14 días postransferencia y considerando una beta-HCG con un resultado >10 IU/L, realizándose una ecografía transvaginal 1 semana más tarde y repitiéndola hasta la detección del latido fetal). Finalmente se analizaran las tasas de abortos (fracaso de la gestación antes de la 22 semana de gestación) y las tasas de nacidos vivos (cuando el feto nacía vivo más allá de la 22 semana de gestación).

Se registrarán factores de confusión como: causa de esterilidad, tabaquismo, número de ciclos de FIV y características del semen que serán tenidos en consideración en el estudio estadístico

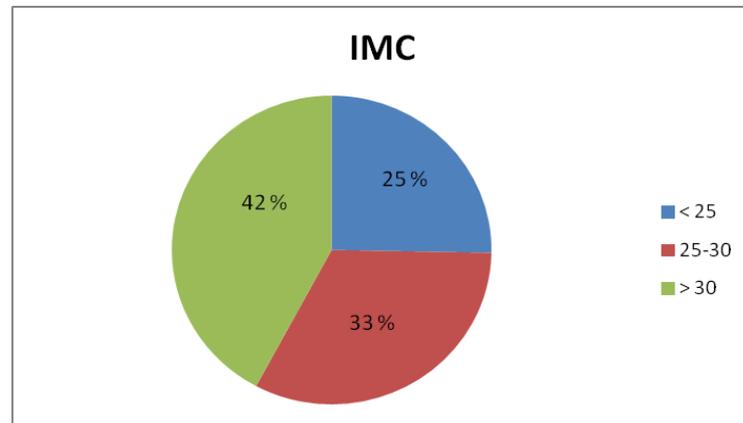
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tanto las variables cuantitativas como las cualitativas, serán almacenadas en una hoja de datos estándar para posterior análisis estadístico utilizando el paquete informático SPSS/ PC 12; SPSS Inc. Chicago, IL. Los datos serán expresados en medias \pm SD o medianas. Para todos los parámetros medidos se realizará análisis estadísticos entre los distintos grupos de pacientes usándose test paramétrico o no paramétricos, según la distribución de los valores con arreglo o no a la normalidad. Análisis de varianza, test de Chi cuadrado para variables cualitativas, comparaciones de medias mediante t-test para variables cantitativas que se distribuyan con arreglo a la normalidad o test de Kolmogrov-Sminov cuando no se distribuyan según la normalidad, Z-test para comparación de porcentajes y análisis multivariantes serán las pruebas estadísticas a realizar. Para la correlación entre parámetros con una distribución normal se calculará el coeficiente de correlación de Pearson, definiéndose la correlación como estadísticamente significativa con una $p < 0,05$. Para la realización de estos cálculos y su ampliación, en caso necesario, se contará con el asesoramiento del departamento de Matemáticas de la Universidad de Oviedo

RESULTADOS

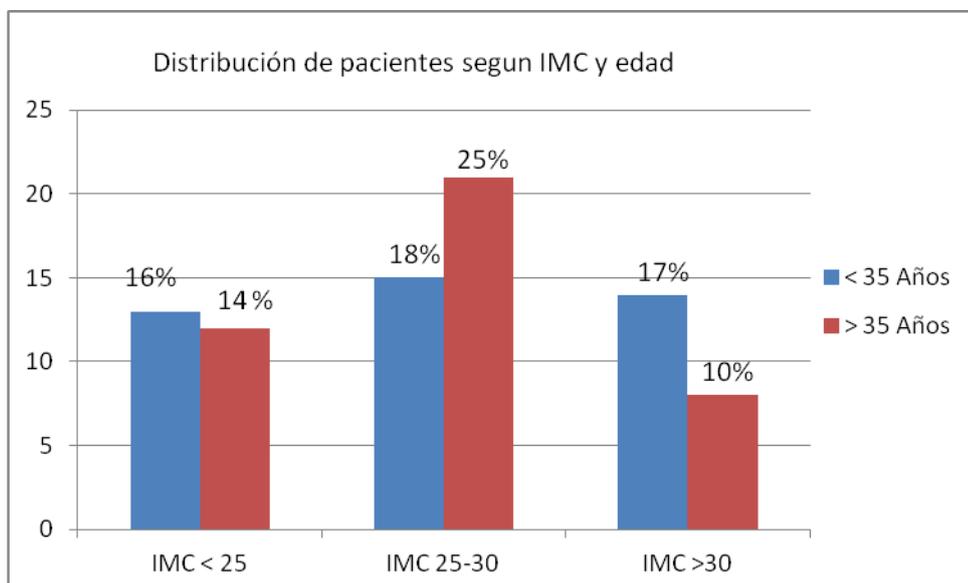
El total de 83 pacientes reclutadas se distribuye con arreglo a su IMC según se muestra en la figura 1.

Figura 1



Consideradas estas pacientes con arreglo a la edad, su distribución según el IMC se muestra en la figura 2.

Figura 2



Al realizar el estudio estadístico de diferencias de IMC de la muestra según los grupos de edad se aprecia que no hay diferencias significativas tal y como se muestra en la tabla I.

Tabla I de contingencia Edad35 * IMC (agrupada)

			IMC (agrupada)		Total
			≤ 30	>30	≤30
Recuento	Edad	≤ 35	16	13	29
		>35	16	18	34
	Total		32	31	63
% de Edad35	Edad	≤ 35	55,2%	44,8%	100,0%
		>35	47,1%	52,9%	100,0%
	Total		50,8%	49,2%	100,0%
% de IMC (agrupada)	Edad	≤ 35	50,0%	41,9%	46,0%
		>35	50,0%	58,1%	54,0%
	Total		100,0%	100,0%	100,0%

P= 0.616

Cuando se consideraron las distintas variables objeto del estudio, se observo que la única variable en la que se obtuvieron diferencias fue la tasa de embarazo que se resume en la siguiente gráfica. De esta manera se observan que las pacientes que presentan las mayores tasas de embarazo son las que se encuentran en normopeso. Al comparar las pacientes con sobrepeso respecto a las obesas se constata una tasa menor de embarazo estadísticamente significativa en las mujeres con sobrepeso tal y como se muestra en la figura 3 y 4.

Figura 3

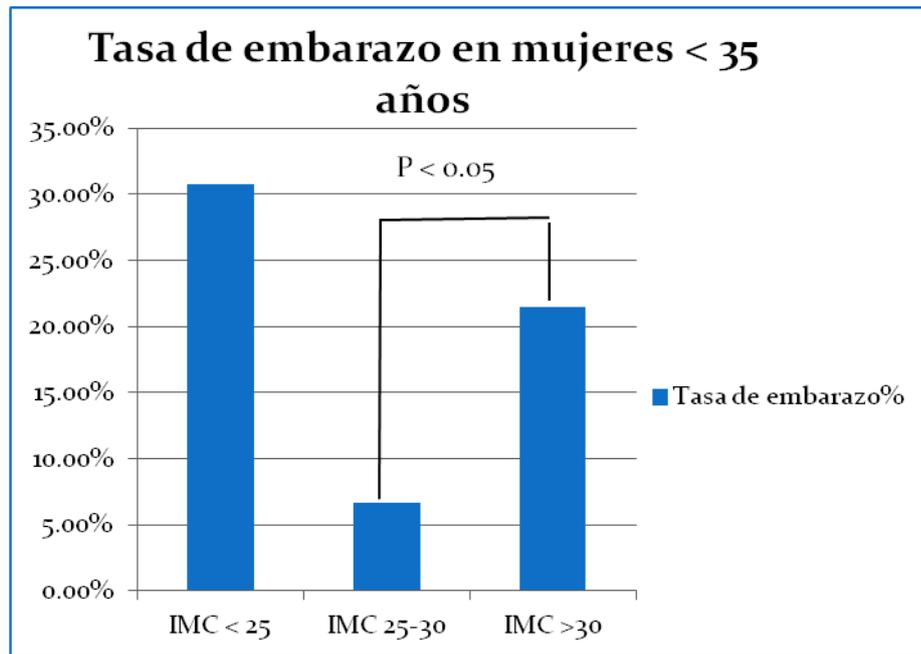
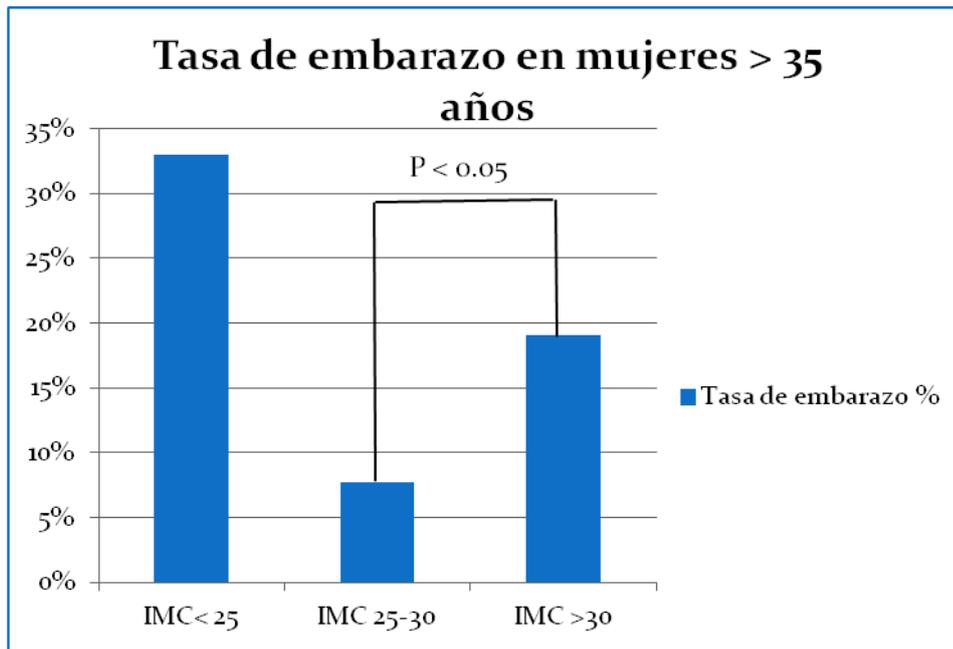


Figura 4



Tal como se muestra en la Tabla II y III no se observan diferencias significativas en la tasa de embarazos cuando se considera la edad como variable dependiente de manera que sólo el IMC se asocia con los mejores resultados en la tasa de embarazo.

Tabla II

			Embarazo		Total
			0	1	0
Edad	≤35	Recuento	25	4	29
		% de Edad35	86,2%	13,8%	100,0%
		% de Embarazo	46,3%	44,4%	46,0%
	>35	Recuento	29	5	34
		% de Edad35	85,3%	14,7%	100,0%
		% de Embarazo	53,7%	55,6%	54,0%
Total		Recuento	54	9	63
		% de Edad35	85,7%	14,3%	100,0%
		% de Embarazo	100,0%	100,0%	100,0%

P = 1.000

Tabla III

			Embarazo		Total
			0	1	0
Recuento	IMC	≤ 30	30	2	32
		(agrupada)			
		>30	24	7	31
	Total		54	9	63
% de IMC	IMC	≤ 30	93,8%	6,3%	100,0%
		(agrupada)			
		>30	77,4%	22,6%	100,0%
	Total		85,7%	14,3%	100,0%
% de Embarazo	IMC	≤ 30	55,6%	22,2%	50,8%
		(agrupada)			
		>30	44,4%	77,8%	49,2%

Total	100,0%	100,0%	100,0%
-------	--------	--------	--------

P = 0.082

En las tablas siguientes se atenderá al resto de parámetros analizados en estos resultados preliminares: el número de ovocitos recogidos, el número de folículos puncionados, la concentración espermática y la motilidad espermática progresiva. Primeramente analizaremos los datos en función del IMC y posteriormente en función del grupo de edad. Se aprecia una cierta tendencia a que las mujeres obesas suelen tener unos mejores resultados que las que tienen sobrepeso, aunque en cualquiera de los dos casoS no se aprecian diferencias significativas. Así mismo las mujeres más jóvenes tienen una tendencia a mejores resultados en cuanto a la media de ovocitos recogidos y folículos puncionados, pero también peores resultados en cuanto a los parámetros espermáticos.

	IMC (agrupada)	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Nº de ovocitos recogidos	≤ 30	32	9,09	4,417	,781
	>30	31	11,00	5,086	,913
Nº folículos puncionados	≤ 30	32	11,41	4,731	,836
	>30	31	13,61	7,121	1,279
Concentracion espermatica	≤ 30	32	30,69	31,119	5,501
	>30	31	32,34	29,478	5,294
Motilidad espermatica % grado A	≤ 30	32	22,41	17,868	3,159
	>30	31	24,39	15,905	2,857

Prueba de muestras independientes

No se han asumido varianzas iguales

Prueba T para la igualdad de medias Sig. (bilateral)

Nº de ovocitos recogidos	,118
Nº folículos puncionados	,155

Concentracion espermatica	,830
Motilidad espermatica % grado A	,644

Estadísticos de grupo

	Edad 35	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Nº de ovocitos recogidos	≤35	29	11,17	4,993	,927
	>35	34	9,06	4,505	,773
Nº foliculos puncionados	≤35	29	14,14	7,029	1,305
	>35	34	11,09	4,808	,824
Concentracion espermatica	≤35	29	25,01	26,202	4,866
	>35	34	37,04	32,401	5,557
Motilidad espermatica % grado A	≤35	29	25,38	21,844	4,056
	>35	34	21,68	10,973	1,882

Prueba de muestras independientes

No se han asumido varianzas iguales

Prueba T para la igualdad de medias Sig. (bilateral)

Nº de ovocitos recogidos	,085
Nº foliculos puncionados	,054
Concentracion espermatica	,109
Motilidad espermatica % grado A	,413

DISCUSIÓN

Con estos resultados preliminares podemos observar que las mujeres con normopeso tienen unas mejores tasas de embarazo bioquímico que aquellas con sobrepeso u obesas, lo que coincide con la mayoría de los artículos publicados, ya que la obesidad influye de forma negativa en todo el proceso reproductivo con una mayor incidencia de infertilidad, menor probabilidad de éxito en las técnicas de reproducción asistida (TAR) y, en caso de lograr una gestación, con mayor incidencia de complicaciones durante el embarazo¹⁴.

En un estudio de 712 ciclos en pacientes que conseguían embarazos mediante técnica de donación de oocitos se utilizó este modelo para descartar posibles variables de confusión como la edad de la madre o la calidad del oocito, y se observó una tendencia hacia tasas más bajas de implantación y tasas de abortos significativamente más altas en las mujeres obesas que en las normales o con sobrepeso⁵⁴. Sin embargo, los mismos autores en un trabajo posterior en el consideraban 2656 ciclos de donación de oocitos encontraban cifras similares de tasas de implantación, embarazo y abortos en los distintos grupos de IMC en que habían dividido a sus pacientes, de modo que el papel del endometrio si existe parece debil⁵⁵ y probablemente asociado a la alteración de algunos genes relacionados con la ventana de implantación⁵⁶. Se concluye así que la obesidad tiene un efecto negativo en el endometrio independientemente de su efecto en la calidad del oocito. Este aspecto resulta de especial interés, pero no es fácil de estudiar nuestras pacientes que no utilizaron la técnica de donación de oocitos, ya que requeriría una evaluación histológica del tejido endometrial, previa a la transferencia lo que resulta imposible porque empeoraría las tasas de implantación. La evaluación del endometrio mediante ecografía en el día de la transferencia, aunque más imprecisa, resultaría la forma más lógica de evaluar su calidad y será considerada como un parametro más a estudiar en el diseño de futuras investigaciones.

En las mujeres la fertilidad declina de manera progresiva con la edad debido a la depleción de la reserva folicular ovárica y la peor calidad de los oocitos. De hecho en muchas mujeres, los resultados de TRA se opta por la edad de 35 años para comparar los resultados⁸. Este parámetro ha sido considerado en nuestro trabajo, sin que se observasen diferencias significativas, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.

Se han comunicado peores respuestas a la inducción de la ovulación, siendo necesario el empleo de dosis más elevadas de gonadotrofinas en las mujeres en obesas³⁷. Además en estas mujeres se obtiene una menor tasa de oocitos y tienen tasas más bajas de fertilización y superovulación. Además, cuando se realiza la estimulación ovárica en las TRA no sólo se obtienen menos oocitos en las mujeres obesas, sino que son también menores las tasas de fertilización y la calidad del embrión. En nuestro trabajo, si atendemos al IMC podemos apreciar que las mujeres obesas presentan una tendencia a unos mejores resultados en el número de ovocitos recogidos y los folículos puncionados. Lo que se contrapone con algunos estudios que afirmaba que cuando se realiza la estimulación ovárica en las técnicas de las TRA no sólo se obtienen menos oocitos en las mujeres obesas, sino que son también menores las tasas de fertilización y la calidad del embrión^{38, 51}.

Respecto a las mejores tasas de fertilización observada en mujeres obesas frente a las mujeres en sobrepeso, se podría explicar en que estas mujeres se estimularon con dosis más elevadas de gonadotrofinas ya que las mujeres obesas tienen peores respuestas a la inducción de la ovulación³⁷.

En cuanto a la ligera tendencia de unos mejores resultados en los parametros espermáticos en función de la edad, quizás se podrían explicar por la organización del programa de FIV-ICSI, ya que una de las principales indicaciones de estas técnicas es el factor masculino severo, de manera que parejas de menor edad con esta patología utilizarían directamente estas técnicas, mientras que parejas de más edad al tener un mejor seminograma podrían haber realizado anteriormente técnicas de inseminación artificial.

Nuestro estudio presenta limitaciones debido al pequeño tamaño muestral y al posible sesgo del grupo control que ha sido reclutado en una población de pacientes que pudiera no ser plenamente del efecto de la obesidad ya que algunos grupos han establecido el nivel de corte a partir del cual los resultados empeoran en un IMC de 30, por lo que los resultados obtenidos deben ser considerados con cautela y no generalizarse para el total de la población. Sin embargo, este estudio piloto puede servir de base para demostrar la factibilidad de reproducir la investigación en una muestra más amplias. Siendo útiles los resultados para realizar un adecuado cálculo del tamaño muestral, y las dificultades observadas, para mejorar y poner a punto la recogida del material y el diseño del estudio con vista a la realización de un estudio de cohortes que

presente un poder estadístico potente para confirmar o rechazar la hipótesis que planteamos.

CONCLUSIONES

- 1) Las tasas de embarazo en nuestro medio para mujeres en normopeso se encuentran dentro de los valores normales comunicados en la literatura.
Las mujeres con sobrepeso presentan peores tasas de embarazo que las mujeres con normopeso u obesas, siendo necesario profundizar en el estudio de estas diferencias.
- 2) El diseño experimental resulta factible en nuestro medio habiéndose observado algunos aspectos que precisan de mejoras como puede ser el estudio ecográfico del endometrio en el momento de la transferencia, así como los parámetros seminales, variables a añadir en un futuro proyecto de investigación.
- 3) La distribución de pacientes respecto al IMC está de acuerdo con los datos registrados en la literatura por lo que se estima que el tamaño muestral calculado para testar la hipótesis del proyecto debería de ser también adecuado.

La realización de este estudio nos permitirá conocer el escenario clínico en el que se desarrollará posteriormente el proyecto de investigación que mencionamos, con el fin de evitar errores y optimizar el gasto económico que dicho proyecto supondría.

BIBLIOGRAFIA

1. James WP. European diet and public health: the continuing challenge. *Public Health Nutr.* 2001;4(2A):275-292.
2. Aranceta J, Perez-Rodrigo C, Serra-Majem L, et al. Prevention of overweight and obesity: a Spanish approach. *Public Health Nutr.* 2007;10(10A):1187-1193.
3. Pan L, Freedman DS, Gillespie C, Park S, Sherry B. Incidences of obesity and extreme obesity among US adults: findings from the 2009 Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Popul Health Metr.* 2011;9(1):56.
4. Bellver J, Ayllon Y, Ferrando M, et al. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil Steril.* 2010;93(2):447-454.
5. Leong SL, Madden C, Gray A, Waters D, Horwath C. Faster self-reported speed of eating is related to higher body mass index in a nationwide survey of middle-aged women. *J Am Diet Assoc.* 2011;111(8):1192-1197.
6. Eckel LA. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol Behav.* 2011;104(4):517-524.
7. Burt Solorzano CM, McCartney CR. Obesity and the pubertal transition in girls and boys. *Reproduction.* 2010;140(3):399-410.
8. Hourvitz A, Machtinger R, Maman E, Baum M, Dor J, Levron J. Assisted reproduction in women over 40 years of age: how old is too old? *Reprod Biomed Online.* 2009;19(4):599-603.
9. Price TM, O'Brien SN, Welter BH, George R, Anandjiwala J, Kilgore M. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase--possible mechanism of body fat distribution. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(1 Pt 1):101-107.
10. Sutton-Tyrrell K, Zhao X, Santoro N, et al. Reproductive hormones and obesity: 9 years of observation from the Study of Women's Health Across the Nation. *Am J Epidemiol.* 2010;171(11):1203-1213.
11. Bohler H,Jr, Mokshagundam S, Winters SJ. Adipose tissue and reproduction in women. *Fertil Steril.* 2010;94(3):795-825.

12. Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia*. 2011;43(2):121-128.
13. Tingthanatikul Y, Choktanasiri W, Rochanawutanon M, Weerakeit S. Prevalence and clinical predictors of endometrial hyperplasia in anovulatory women presenting with amenorrhea. *Gynecol Endocrinol*. 2006;22(2):101-105.
14. Brannian JD. Obesity and fertility. *S D Med*. 2011;64(7):251-254.
15. Alvarez-Castro P, Sangiao-Alvarellos S, Brandon-Sanda I, Cordido F. Endocrine function in obesity. *Endocrinol Nutr*. 2011;58(8):422-432.
16. Rosenfield RL, Bordini B. Evidence that obesity and androgens have independent and opposing effects on gonadotropin production from puberty to maturity. *Brain Res*. 2010;1364:186-197.
17. Askari H, Tykodi G, Liu J, Dagogo-Jack S. Fasting plasma leptin level is a surrogate measure of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(8):3836-3843.
18. Reinehr T. Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316(2):165-171.
19. Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci*. 2005;330(6):280-289.
20. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med*. 2010;152(2):93-100.
21. Rosicka M, Krsek M, Matoulek M, et al. Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiol Res*. 2003;52(1):61-66.
22. Loh K, Fukushima A, Zhang X, et al. Elevated Hypothalamic TCPTP in Obesity Contributes to Cellular Leptin Resistance. *Cell Metab*. 2011.
23. Wauman J, Tavernier J. Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. *Front Biosci*. 2011;17:2771-2793.
24. Spicer LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol*. 2001;21(4):251-270.

25. Karamouti M, Kollia P, Kallitsaris A, Vamvakopoulos N, Kollios G, Messinis IE. Modulating effect of leptin on basal and follicle stimulating hormone stimulated steroidogenesis in cultured human lutein granulosa cells. *J Endocrinol Invest.* 2009;32(5):415-419.
26. Procaccini C, Jirillo E, Matarese G. Leptin as an immunomodulator. *Mol Aspects Med.* 2011.
27. Tersigni C, Di Nicuolo F, D'Ippolito S, Veglia M, Castellucci M, Di Simone N. Adipokines: new emerging roles in fertility and reproduction. *Obstet Gynecol Surv.* 2011;66(1):47-63.
28. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2005;352(12):1223-1236.
29. Apridonidze T, Essah PA, Iuorno MJ, Nestler JE. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):1929-1935.
30. Cardozo E, Pavone ME, Hirshfeld-Cytron JE. Metabolic syndrome and oocyte quality. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(3):103-109.
31. Raposinho PD, Pedrazzini T, White RB, Palmiter RD, Aubert ML. Chronic neuropeptide Y infusion into the lateral ventricle induces sustained feeding and obesity in mice lacking either Npy1r or Npy5r expression. *Endocrinology.* 2004;145(1):304-310.
32. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004;81(1):19-25.
33. Rosenbaum D, Haber RS, Dunaif A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. *Am J Physiol.* 1993;264(2 Pt 1):E197-202.
34. Brzechffa PR, Jakimiuk AJ, Agarwal SK, Weitsman SR, Buyalos RP, Magoffin DA. Serum immunoreactive leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(11):4166-4169.
35. Rouru J, Anttila L, Koskinen P, et al. Serum leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(6):1697-1700.

36. Pehlivanov B, Mitkov M. Serum leptin levels correlate with clinical and biochemical indices of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2009;14(2):153-159.
37. Maheshwari A, Stofberg L, Bhattacharya S. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology--a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2007;13(5):433-444.
38. Zhang D, Zhu Y, Gao H, et al. Overweight and obesity negatively affect the outcomes of ovarian stimulation and in vitro fertilisation: a cohort study of 2628 Chinese women. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(5):325-332.
39. Fedorcsak P, Storeng R, Dale PO, et al. Leptin and leptin binding activity in the preovulatory follicle of polycystic ovary syndrome patients. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000;60(8):649-655.
40. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril*. 2002;77(3):433-444.
41. Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):1072-1076.
42. Gurbuz B, Yalti S, Ficicioglu C, Tasdemir S. The relation of serum and follicular fluid leptin and ovarian steroid levels in response to induction of ovulation in in vitro fertilization cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005;118(2):214-218.
43. Almog B, Azem F, Kapustiansky R, et al. 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*. 2011;27(9):666-668.
44. Takikawa S, Iwase A, Goto M, et al. Assessment of the predictive value of follicular fluid insulin, leptin and adiponectin in assisted reproductive cycles. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(7):494-499.
45. De Placido G, Alviggi C, Clarizia R, et al. Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques. *J Endocrinol Invest*. 2006;29(8):719-726.

46. La Vignera S, Condorelli R, Bellanca S, et al. Obesity is associated with a higher level of pro-inflammatory cytokines in follicular fluid of women undergoing medically assisted procreation (PMA) programs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(3):267-273.
47. Sakumoto R, Shibaya M, Okuda K. Tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) inhibits progesterone and estradiol-17beta production from cultured granulosa cells: presence of TNFalpha receptors in bovine granulosa and theca cells. *J Reprod Dev.* 2003;49(6):441-449.
48. Achour A, M'bika JP, Baudouin F, Caruelle D, Courty J. Pleiotrophin induces expression of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *Biochimie.* 2008;90(11-12):1791-1795.
49. Ikeda S, Ichihara-Tanaka K, Azuma T, Muramatsu T, Yamada M. Effects of midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. *Biol Reprod.* 2000;63(4):1067-1074.
50. Su HI, Sammel MD, Freeman EW, Lin H, DeBlasis T, Gracia CR. Body size affects measures of ovarian reserve in late reproductive age women. *Menopause.* 2008;15(5):857-861.
51. Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LC, Strauss JF,3rd. Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. *Fertil Steril.* 2007;87(1):101-106.
52. Robker RL, Akison LK, Bennett BD, et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1533-1540.
53. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:28.
54. Bellver J, Rossal LP, Bosch E, et al. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertil Steril.* 2003;79(5):1136-1140.
55. Bellver J, Melo MA, Bosch E, Serra V, Remohi J, Pellicer A. Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertil Steril.* 2007;88(2):446-451.

56. Bellver J, Martinez-Conejero JA, Labarta E, et al. Endometrial gene expression in the window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95(7):2335-41, 2341.e1-8.

57. Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, et al. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(10):951-958.

58. Pandey S, Pandey S, Maheshwari A, Bhattacharya S. The impact of female obesity on the outcome of fertility treatment. *J Hum Reprod Sci*. 2010;3(2):62-67.

59. Llaneza P, Gonzalez C, Fernandez-Inarrea J, et al. Soy isoflavones, diet and physical exercise modify serum cytokines in healthy obese postmenopausal women. *Phytomedicine*. 2011;18(4):245-250.