

11217



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER

**“EXPRESION SERICA E INTRAFOLICULAR DE LA
CONCENTRACION DE LEPTINA COMO MARCADOR
DE HIPOXIA EN LAS CARACTERISTICAS DEL
DESARROLLO OVOCITARIO”**

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

PRESENTA

DRA. VIVIAN PATRICIA CRUZ MINOLI

PROFESOR TITULAR DEL CURSO:

DR. HECTOR HUGO BUSTOS LOPEZ

PROFESOR ADJUNTO:

DR. GABRIEL ROJAS POCEROS

ASESOR DE TESIS:

DR. GERARDO BARROSO VILLA



MEXICO, D. F.

FEBRERO 2005

0348494



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FIRMAS

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: VIVIAN PATRICIA CIRVA MINOLI
FECHA: 27-09-05
FIRMA: [Handwritten Signature]

[Handwritten Signature]

DR. JOSE JAVIER ELIZALDE GONZALEZ
Jefe de la División de Enseñanza e Investigación



[Handwritten Signature]

DR. HECTOR HUGO BUSTOS LOPEZ
Profesor titular del curso de Especialidad en Ginecología y obstetricia

[Handwritten Signature]

DR. GABRIEL ROJAS POCEROS
Profesor Adjunto del curso de Especialización de Ginecología y obstetricia

[Handwritten Signature]

DR. GERARDO BARROSO VILLA
Profesor Asesor de tesis



[Handwritten Signature]

DR. ROBERTO ALMANZA
Jefe del departamento de Ginecología y Obstetricia

AGRADECIMIENTOS

A DIOS POR SU VOLUNTAD PARA CONMIGO

A MIS PADRES Y HERMANOS POR SU AMOR, CONFIANZA Y APOYO QUE RECIBO DIA CON DIA SIENDO UNO DE LOS PILARES MÁS IMPORTANTES PARA CONTINUAR ADELANTE

A MI TUNAS POR SU APOYO INCONDICIONAL, POR SU AMOR, COMPRENSION Y CUYO EJEMPLO CONSTITUYE UN ALICIENTE PARA MI SUPERACION PERSONAL Y PROFESIONAL. ERES LO MEJOR QUE ME HA SUCEDIDO EN LA VIDA. GRACIAS

A MIS COMPAÑEROS POR SU AMISTAD Y APOYO

CON ESPECIAL Y ENTERO AGRADECIMIENTO A TODOS Y CADA UNO DE MIS MAESTROS DEL HOSPITAL ABC, YA QUE CONTRIBUYERON A MI DESARROLLO PERSONAL Y PROFESIONAL Y QUIENES CON SU HABILIDAD QUIRURGICA, JUICIO CLINICO HAN SIDO UNA CONSTANTE INSPIRACION A TRAVES DE ESTOS AÑOS

AI DR. HECTOR BUSTOS POR SU ENTREGA Y DEDICACION PARA MI FORMACION PROFESIONAL DURANTE ESTOS AÑOS COMO PROFESOR TITULAR DEL CURSO

AL DR. GERARDO BARROSO POR SU ENSEÑANZA Y EL TIEMPO QUE EMPLEO EN LA ELABORACION DE ESTA TESIS

AL PERSONAL ADMINISTRATIVO Y DE ENFERMERIA POR SU APOYO, CONFIANZA Y TENER SIEMPRE UNA SONRISA

Objetivo: Evaluar las condiciones de madurez ovular y desarrollo embrionario a partir de la concentración sérica e intrafolicular de leptina.

Tipo de estudio: Estudio prospectivo y observacional

Material y método: Se incluyeron un total de 30 ciclos de estimulación ovárica controlada para procedimientos de FIV / ICSI, en donde se realizó la medición sérica y de contenido intrafolicular de la concentración de leptina en folículos individuales durante la captura ovular para relacionar con sus características de madurez.

Resultados: Durante un ciclo de estimulación ovárica controlada de 30 pacientes, subdivididas en dos grupos de edades, menores y mayores de 35 años, se encontró que no existen diferencias expresadas en los valores basales de FSH, LH e IMC por diseño de estudio, pero existe una relación directamente proporcional entre los valores altos de estradiol sérico y la cantidad de óvulos fertilizados en pacientes < 35 años los cuales se correlacionan con una menor concentración de leptina en el día 3 del ciclo y día de aplicación de hGC con una $P= 0.04$ y 0.05 respectivamente.

Conclusión: Pacientes llevadas a ciclos de estimulación ovárica mayores de 35 años de edad, presentan concentraciones más elevadas de leptina sérica e intrafolicular relacionadas con una concentración baja de estradiol. En donde esta condición de contraregulación intrafolicular es expresada por un menor número de óvulos fertilizados y una disminución en la calidad ovocitaria, requiriendo posiblemente de mayor cantidad de gonadotropinas para su estimulación.

Palabras claves: Leptina, líquido folicular, FIV, ICSI.

INDICE

	PAGINAS
1. INTRODUCCIÓN	6
a. Características bioquímicas de la leptina	8
b. Sistemas de retroalimentación para la expresión de leptina	9
c. Señalización de los procesos reproductivos a través de la leptina	10
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVO	13
4. MATERIAL Y MÉTODO	14
5. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA	21
6. RESULTADOS	21
7. DISCUSIÓN	22
8. TABLAS	24
9. BIBLIOGRAFÍA	27

INTRODUCCIÓN

La foliculogénesis constituye la base fundamental en la actividad ovárica, teniendo como propósito la producción de esteroides ováricos y la consecuente maduración ovocitaria. Tanto las células de la teca como de la granulosa permiten llevar a cabo la actividad esteroidogénica y la síntesis de factores de crecimiento. La producción de estradiol es el resultado integral en la activación de enzimas esteroidogénicas a través de vías de transcripción para genes específicos. La proliferación de células de la teca, granulosa y la influencia de factores peptídico estimuladores o inhibidores presentan una relación estrecha tanto local como sistémica con sus correspondientes proteínas de unión. El efecto estrogénico depende en buena medida de la concentración de estos esteroides, la densidad de sus receptores, así como, de la afinidad y actividad en la cinética del complejo hormona-receptor.

Es evidente que ciertos moduladores no-esteroidogénicos para la liberación de gonadotropinas son producidos en el ovario, en donde algunos de ellos, juegan un papel crucial en la función reproductiva. La foliculogénesis ovárica, esta sustentada por la interacción endocrino-parácrino para la maduración ovocitaria, en la cuál exista un adecuado desempeño de los mecanismos intracelulares entre células de la teca, granulosa y factores metabólico/regulatorio que se encuentran presentes en el líquido folicular. Este sistema de regulación intrafolicular esta compuesto por diversas sustancias las cuales incluyen factores de crecimiento, citoquinas, neuropéptidos y moléculas vasoregulatoras. La homeostasis folicular permite el desarrollo de óvulos sanos, fertilizables con una adecuada luteinización y que dependen de una relación estricta entre las moléculas de regulación y proteínas de orden angiogénico.

El concepto de competencia ovular bajo el entorno en la arquitectura vascular perifolicular ha sido previamente descrito en la transferencia de embriones provenientes de folículos en forma individual (Van Blerkom *et al.*, 1997). Algunos de estos factores producidos dentro del líquido folicular y secretados a

la circulación sistémica pueden potencialmente, servir como factor predictivo de mayor precisión en el desarrollo ovular y embrionario. El análisis bioquímico del contenido metabólico intrafolicular (presencia de productos bio-metabólicos, disolución en el contenido de O₂/CO₂, pH, factores de crecimiento y proteínas reguladoras) han mostrado que el comportamiento de las células de la granulosa y el flujo vascular perifolicular tienen una relación estrecha en la calidad ovocitaria, en los mecanismos de fertilización y en el subsiguiente desarrollo embrionario (Van Blerkom 1998; Nargund *et al.*, 1996; Huey *et al.*, 1999). Los índices de resistencia con la utilización de ultrasonografía Doppler han servido como marcadores de crecimiento folicular cuando se relacionan los factores de resistencia e impedancia en el flujo vascular, relacionados directamente con diversos factores angiogénicos. Ciertas características de flujo vascular y de capilaridad perifolicular han sido descritas en folículos antrales evaluados en forma individual y en ciclos estimulados en fertilización In- Vitro. (Nargund *et al.*, 1996; Van Blerkom *et al.*, 1997).

Huey y colaboradores (1999) analizaron en forma prospectiva la vascularidad en folículos ováricos individuales y su componente microambiental para evaluar su capacidad de desarrollo ovocitario. Estos autores observaron que los índices Doppler (índice de resistencia, índice de pulsatilidad, y relación sístole/diástole) muestran una correlación negativa en el proceso de división celular dentro de las primeras 72 horas posteriores a la fertilización. El tiempo para la activación del genoma embrionario en el hombre es relevante, en donde la estructura morfológica y las características fisiológicas en embriones fertilizados están relacionadas al grado de vascularización folicular. Del mismo modo cambios en los patrones de síntesis de polipéptidos durante el estado preimplantacional en el desarrollo humano ocurrirán entre los estadios de cuatro- y ocho- células los cuales serán dependientes del gen de transcripción peptídica.

El desarrollo folicular ovárico en ciclos de inducción de la ovulación, muestra una expresión única caracterizada por diferencias cualitativas y cuantitativas tanto de hormonas esteroides (Hartshorne *et al.*, 1989), proteínas (Nargund *et al.*, 1996), y en el contenido de oxígeno disuelto (Van Blerkom *et al.*, 1997). La capacidad esteroideogénica de las células de la granulosa y del cúmulo

capacidad esteroidogénica de las células de la granulosa y del cúmulo oophorus, incluyen una secreción de diversos factores de crecimiento. Recientemente, se han identificado ciertos factores relacionados a las condiciones de hipoxia y competencia ovular los cuales son producidos por las células de la granulosa.

Uno de estos reguladores es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), quien se encarga de promover la expansión celular endotelial y formación vascular (Kamat *et al.*, 1995; Van Blerkom *et al.*, 1997), por otro lado, se ha observado que la leptina, actúa como una proteína moduladora involucrada en diversas actividades metabólicas y de orden reproductivo (Chehab *et al.*, 1996; Cioffi *et al.*, 1997). Aunque la función de los genes de activación de la leptina folicular no ha sido determinada, la esteroidogénesis ovárica (Chehab *et al.*, 1997) y la preparación del endometrio para la implantación ha sido sugerida anteriormente (Coiffi *et al.*, 1997).

Características bioquímicas de la Leptina

La leptina es un polipéptido no-glicosilado de 146 aminoácidos, producido por el gen de activación *ob*, y la cuál fue descrito en 1994 (Zhang *et al.*, 1994). La forma precursora de la leptina contiene 167 aminoácidos, siendo activada por la inserción del aminoácido 21 en su cadena estructural. La leptina se encuentra en la circulación como una hormona proteica de 16 kDa, la cuál es secretada predominantemente por el tejido adiposo participando en la regulación del peso corporal y en la ingesta de alimentos. Existiendo una relación entre la concentración plasmática de leptina y el adecuado estado nutricional para la función reproductiva (Ogawa *et al.*, 1995).

Múltiples investigaciones han demostrado la participación de dicha hormona en la patología de diferentes enfermedades entre las que se encuentra la obesidad, anorexia nerviosa, diabetes Mellitus, síndrome de ovario poliquístico, enfermedades inmunes adquiridas, cáncer, síndrome Cushing y deficiencia de hormona del crecimiento (Fruhbeck *et al.*, 1998). Se ha observado que la concentración de leptina unida a proteínas transportadoras esta en relación

cantidad de tejido adiposo presentan una tendencia para la resistencia a la leptina libre circulante (Hoggard *et al.*, 1998).

Es de mencionarse la relación existente entre la expresión del gen *ob* como familia de la citoquinas y la hipófisis anterior. Estos mecanismos han sido relacionados desde el punto de vista reproductivo con los procesos de ovulación de las células de la teca, granulosa y en la subsiguiente maduración ovocitaria y procesos de fertilización (Cunningham *et al.*, 1999).

Sistemas de retroalimentación para la expresión de Leptina

Existen múltiples efectos de la leptina en la ingesta de alimentos y en el control de energía, siendo mediados estos por la liberación de neurotransmisores a nivel de sistema nervioso central (SNC). Se ha observado una correlación negativa de adrenalina plasmática con la concentración sérica de leptina, sin embargo al utilizar inhibidores específicos de la síntesis de catecolamina (i.e., α -OH-paratiroxina), no ha sido posible correlacionar este fenómeno en forma concreta.

Glucocorticoides e insulina participan en la regulación del metabolismo de la leptina, con acción a largo plazo sobre el omento y tejido adiposo sub-abdominal. Por el contrario mantiene una correlación inversa con el cortisol (Antczak *et al.*, 1997).

La leptina actúa como regulador de la función hipotálamo-hipófisis-ovario, siendo esta un indicador metabólico, del eje reproductivo en primates, donde la leptina incrementa la concentración plasmática de LH y FSH; así como la amplitud y la frecuencia de los pulsos de LH. Las pacientes con amenorrea hipotalámica, están caracterizadas por concentraciones plasmáticas bajas de leptina comparadas con los controles (Licinio *et al.*, 1998). La administración de FSH induce incrementos paralelos de concentración en suero de estrógenos y leptina (Mannucci *et al.*, 1998; Messinis *et al.*, 1998).

Señalización de los procesos reproductivos a través de la leptina

Una hipótesis interesante, es que la leptina actúa como señal periférica en el estado nutricional que se requiere para la función reproductiva, ya que bajas concentraciones plasmáticas de esta indican estados inadecuados de nutrición, en donde las condiciones energéticas durante el embarazo se hacen presentes pudiendo prevenir embarazos no deseados, los cuales requieren de demandas energéticas adicionales para soportar el crecimiento del feto. Sin embargo la leptina no es un marcador sensible del estado nutricional (Korbonits *et al.*, 1997).

Por otra parte, la obesidad se caracteriza por el incremento en la concentración de leptina, una idea atractiva es que la obesidad podría ser un estado de resistencia a la misma, cuando esta se encuentra libre en el plasma, pero la evidencia para esta hipótesis esta limitada (Bútzow *et al.*, 1999). En algunos casos la deficiencia congénita de leptina ha sido reportada, como la síntesis baja de leptina (Strobel *et al.*, 1998) o mutaciones en el sitio de unión al receptor de leptina (Clément *et al.*, 1998).

Diversos estudios han demostrado que la leptina tiene fluctuación fisiológica durante el ciclo menstrual y estas concentraciones son significativamente más bajas en la fase folicular temprana, donde la concentración de leptina no está influenciada directamente por la actividad de estrógenos y progesterona (González *et al.*, 2000).

En adición, dentro de los efectos de la leptina en pacientes obesas, está asociada a incrementos en la producción de andrógenos ováricos con una contribución en la patogénesis del síndrome de ovario poliquístico, encontrando concentraciones elevadas de leptina en pacientes con anovulación y dicho síndrome, lo que sugiere que valores elevados pueden contribuir a la infertilidad en estas pacientes por la co-interacción de los efectos sensibilizantes del factor de crecimiento de la insulina-I (IGF-I) en folículos dominantes. (Zachow *et al.*, 1997).

Algunos datos sugieren que la producción de leptina puede estar influenciada por el estado ovárico funcional. Durante la fecundación in Vitro (FIV) altos niveles de leptina asociados con adiposidad están relacionados con una reducción en la respuesta ovárica. Entonces altas concentraciones de leptina plasmática reducen la respuesta ovárica a gonadotropinas lo que lleva a un aumento en su dosis para lograr una adecuada estimulación ovárica (Unkila-Kallio *et al.*, 2001).

Son pocos los estudios que relacionan la capacidad del folículo ovárico con la actividad y expresión de la leptina dentro del líquido folicular. El presente estudio pretende en forma prospectiva evaluar la dinámica de los ciclos de estimulación ovárica y fertilización in-Vitro con la respuesta en la expresión intrafolicular de leptina y su posible papel como marcador de desarrollo ovárico.

Hipótesis Alternativa

La concentración aumentada (sérica y folicular) de la leptina es marcador de calidad ovocitaria y desarrollo embrionario disminuido.

Hipótesis Nula

La expresión en la concentración folicular de leptina no muestra una relación directa ni con calidad ovular ni con desarrollo embrionario.

Objetivo general

1. Evaluar la relación en la concentración intra-folicular de leptina y su expresión en los parámetros de desarrollo ovocitario en ciclos de hiperestimulación ovárica en pacientes con alta y baja respuesta a la estimulación ovárica.

Objetivos específicos.

- 1.1 Identificar la presencia o no de la leptina tanto en su expresión sérica como dentro del líquido folicular.
- 1.2 Determinar el papel de la leptina como indicador de respuesta ovular en ciclos de hiperestimulación ovular.
- 1.3 Relacionar la expresión de marcadores conocidos de reserva ovárica (FSH, LH, estradiol, etc.) con la concentración del complejo leptina y el desarrollo óvulo / embrionario.
- 1.4 Identificar las características de madurez ovular (*MII*, *MI*, *PI*) y su relación con la distribución de leptina.
- 1.5 Evaluar la expresión de leptina en pacientes con alta y baja respuesta a la estimulación ovárica controlada.

Material y Método

Un estudio prospectivo, observacional y aleatorizado fue llevado a cabo en una institución de investigación de tercer nivel dentro de la ciudad de México. Un total de 30 ciclos de fertilización In-Vitro (FIV) fueron incluidos dentro del estudio de acuerdo a los criterios establecidos de inclusión.

Criterios de selección y aleatorización

Pacientes entre 22 y 39 años fueron incluidas dentro del estudio. Los parámetros de reserva ovárica fueron evaluados de acuerdo a la determinación sérica basal en un ciclo no-estimulado (día 3/5 del ciclo) de hormona folículo estimulante (FSH), hormonal luteinizante (LH) y estradiol (E₂). Pacientes con una FSH >10 un/mL por estudio de quimioluminiscencia fueron excluidas del análisis. En adición, pacientes con una relación FSH: LH de uno o mayor (sugestivo de síndrome de ovario poliquístico) fueron también eliminados. Por consiguiente, se seleccionó una población homogénea de pacientes identificadas por su perfil endocrino basal.

Las pacientes fueron asignadas de acuerdo a su edad (predictivo de respuesta ovular) en dos grupos; pacientes ≤ 35 años (grupo I) y pacientes >35 años (grupo II), lo cual se realizó en forma aleatorizada.

Protocolo de inducción de la ovulación

Todas las pacientes fueron suprimidas con agonistas de la hormona liberadora de gonadotrofinas (aGnRH) (lucrin®, laboratorios abbot, ciudad de México). Utilizando el protocolo largo de fase lútea media para la supresión hipotálamo-hipofisiaria. La GnRH fue iniciada en la fase lútea media previo al ciclo estimulado a una dosis de 0.5mg / día y reduciendo a 0.25mg / día al iniciar el primer día del ciclo menstrual, el cual se continuó hasta la administración de gonadotropina corionica humana (hCG). Las pacientes recibieron FSH recombinante (Gonal-F®, laboratorios Serono de México, ciudad de México), a partir del tercer día del ciclo menstrual con una dosis de 300UI. La dosis del medicamento fue ajustada en forma

individual para cada una de las pacientes utilizando el protocolo de disminución escalonada de la dosis (step-down). Cuando se observaron un mínimo de tres folículos > 18mm a través de seguimiento folicular, se administraron 250 mcg de hCG recombinante. Los ciclos fueron cancelados cuando fueron reclutados menos de tres folículos en el octavo día del ciclo estimulado o si la concentración de estradiol sérica se incrementaba en forma inapropiada.

La aspiración folicular se llevó a cabo 34 a 36 horas posterior a la administración de hCG. Únicamente se analizó el resultado de ovocitos preovulatorios maduros (metafase I y II) durante el tiempo de aspiración. El proceso de inseminación dentro del laboratorio se lleva a cabo dependiendo de la indicación establecida para cada caso, estándar o a través de fertilización in-Vitro con inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).

El desarrollo embrionario se lleva a cabo utilizando un medio de cultivo (P1) hasta obtener de 6 a 8 células previas a la transferencia embrionaria. Un promedio de tres embriones fue transferido a la cavidad uterina. Todas las pacientes recibieron suplemento de fase lútea con progesterona micronizada (600 mg intravaginal diariamente). Se realizó cuantificación de la fracción beta de hormona gonadotropina corionica 12 días posteriores a la transferencia embrionaria. El embarazo clínico fue definido como la presencia de saco gestacional por ultrasonido dentro de las cinco a siete semanas de gestación.

Determinación y medición en la concentración de leptina

Principios de la prueba

1. *Primera reacción:* la muestra de ratón leptina esta relacionada simultáneamente al anticuerpo de conejo anti-ratón leptina y la IgG anti-ratón leptina de guinea del cerdo, que son colocados en un microplato adicionando antisuero a cada uno. Subsecuentemente, el anticuerpo de

leptina anti-ratón de conejo/leptina, ratón/complejo IgG anti-ratón leptina de guinea de cerdo son inmovilizado en cada ensayo.

2. *Lavado*: aquellos materiales que no presentaron ligandos de unión fueron removidos a través de lavado.
3. *Segunda reacción*: interacción entre enzimas de peroxidación (horse radish peroxidase (POD) con la expresión de IgG de los anticuerpos secundarios de guinea de cerdo e IgG anti-ratón leptina de guinea de cerdo del complejo inmovilizado en el ensayo.
4. *Lavado*: El excedente del conjugado de POD es removido por cada lavado.
5. *Reacción enzimática*: La relación de POD-conjugado en el microplato es detectada por 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzodine (TMB) solución sustrato.
6. *Medición de la absorbancia*.
7. *Evaluación de los resultados*: La concentración de leptina ratón es determinada por la curva estándar obtenida por delineación de la absorbancia contra la concentración correspondiente de leptina ratón estándar.

Protocolo de prueba

1. Todas las leptinas normales deben ser incluidas en cada prueba.
2. Cada muestra debe ser ensayada en duplicado para asegurar la confianza en los valores obtenidos.
3. La exactitud de la prueba es predominantemente dependiente de la precisión de la pipeta.
4. Para prevenir el secado, las muestras y los reagentes deben ser proporcionados rápidamente. El tiempo para cada plato no debe de exceder 10 minutos.
5. Mantener la misma secuencia en todos los procedimientos.
6. La eliminación completa del contenido es esencial para el buen desempeño.
7. Siguiendo el procedimiento de lavado en orden minimiza el último término.

Procesamiento de la muestra

Preparación de la muestra

Plasma: Colectar la muestra de sangre por veno-punción con anticoagulante, heparina (1 U/mL), EDTA (0.1%) o citrato (0.54%), y luego separar el plasma por centrifugación por 20 minutos a 2,000 XG.

Suero: Colectar la muestra de sangre por veno-punción, permitiendo formar coagulo, y luego separar el suero por centrifugación por 20 minutos a 2,000XG. Evitar la hemólisis durante la colección de suero o plasma. Tanto la muestra de plasma y suero proporcionan los mismos resultados.

Cultivo celular: Las muestras pueden necesitar ser diluidas, con diluyente de muestra.

Evaluación de la leptina con ensayo de ratón

- a. Pipeta con 50uL de diluyente de muestra y 50uL de solución de leptina de ratón en un microtubo de polipropileno rotulado 12,800 pg/mL, y luego mezclar completamente.
- b. Seis microtubos de polipropileno están rotulados con 200, 400, 800, 1,600, 3,200 y 6,400 pg/mL respectivamente, colocar 50 uL de la muestra diluyente en todos los tubos.
- c. Colocar 50 uL de 12,800 pg/mL del tubo de ensayo en el tubo de 6,400 pg/mL y mezclar completamente.
- d. Colocar 50 uL de 6.400 pg/mL del tubo de ensayo en el tubo de 3,200 pg/mL y mezclar completamente.
- e. Repetir este procedimiento de dilución sucesivamente en los tubos restantes.
- f. Un microtubo de polipropileno es rotulado con 0 pg/mL, colocar 50uL de muestra diluyente.

Procedimiento de Prueba

a) Primera reacción:

1. Tomar los microplatos desde la bolsa sellada, después la bolsa debe de estar equilibrada a temperatura ambiente.
2. Lavar cada plato con 300 uL de buffer, luego aspirar el buffer. Repetir nuevamente el procedimiento. Después del lavado, remover cualquier remanente de buffer invirtiendo el plato en el papel toalla.
3. A cada uno, colocar 45 uL de muestra diluyente (marcada como "C") y 50 uL de suero leptina anti-ratón de guinea de cerdo (marcado como "D").
4. Pipeta con 5 uL de muestra (0, 200, 400, 800, 1,600, 3,200, 6,400 y 12,800 pg/mL trabajador estándar de leptina).

Nota: En caso que la concentración de leptina exceda los 12,800 pg/mL, diluir la prueba de muestra con muestra diluyente. La validación de la muestra escogida es recomendada.

5. Cubrir el microplato con un microplato plástico y dejar durante la noche (16-20 horas) a 4 °C.

b) Segunda Reacción:

6. Aspirar bien el contenido y lavar cinco veces con 300 uL de buffer. Después del último lavado, remover cualquier remanente de solución invirtiendo el plato en el papel toalla.
7. Colocar 100 uL de enzima conjugada de IgG anti-guinea de cerdo.
8. Cubrir el microplato e incubar por 3 horas a 4 °C.

c) Reacción enzimática:

9. Aspirar bien el contenido y lavar siete veces con 300 uL de buffer. Después del último lavado, remover cualquier remanente de solución invirtiendo el plato en el papel toalla.
10. Inmediatamente después del lavado, colocar 100 uL de solución de sustrato de enzima (marcada como "G") y reaccionar por 30 minutos a

temperatura ambiente. Durante la reacción enzimática, evitar exponer el microplato a la luz.

11. Detener la reacción enzimática adicionando 100 μ L de solución de suspensión de reacción enzimática (marcada como "H").
12. Medir la absorbancia por plato del lector por 30 minutos (medición de longitud de onda: 450 nm, substrayendo longitud de onda: 630 nm).
13. Calcular concentración de leptina desde la curva estándar.

Determinación de la concentración de leptina ratón

1. El promedio de la absorbancia de cada grupo duplicado de muestras o estándar.

Nota: En caso de que los valores de absorbancia individual difieran por más del 20% desde el valor promedio correspondiente, la re-evaluación es recomendada. El promedio de absorbancia de 0 μ g/mL estándar debe de ser menos de 0.1

2. Construir la curva estándar de leptina de ratón para delinear el valor promedio de absorbancia para cada estándar en Y (lineal) contra la correspondiente concentración de leptina estándar en X (logarítmica).

Nota: La curva estándar debe generarse en cada prueba.

3. La concentración de leptina de la muestra es determinada por la curva estándar usando el valor promedio de absorbancia en cada muestra.

Nota: La concentración de leptina de un ratón normal son unos cuantos ng/mL.

Información adicional

1. *Precisión:*

La precisión intra-ensayo del "ensayo de leptina para ELISA" es C.V=5.4 %.

La precisión inter-ensayo del "ensayo de leptina para ELISA" es C.V=6.9 %.

2. *Recuperar*: Cuando leptina-ratón está clavada en el suero de ratón, la recuperación de la leptina-ratón determinada por "Ensayo de leptina para ELISA es de 92.0%.
3. *Especificidad*: La reactividad cruzada del "Ensayo de leptina para ELISA" es mostrada abajo:

Sustancia	Reactividad
Insulina ratón (1 ug/mL)	No detectable
Péptido-C rata (1 ug/mL)	No detectable
Polipéptido pancreático rata (1 ug/mL)	No detectable
Glucagon (1-37) (1 ug/mL)	No detectable
Glucagon (1-29) (1 ug/mL)	No detectable
ILF-I, recombinante (1ug/mL)	No detectable
ILF-II, recombinante (1 ug/mL)	No detectable
Somatostatina humana (1ug/mL)	No detectable

Evaluación estadística

De acuerdo a la distribución en la población de estudio pruebas paramétricas fueron utilizadas. La prueba de Kolmogorov-Smirnov fue aplicada para observar diferencias en los grupos de estudio relacionados con la concentración de leptina. Los datos fueron expresados como su promedio \pm su desviación estándar. El valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Resultados

Por el diseño de estudio las características demográficas para los dos grupos difieren en el promedio de edad, siendo para el grupo I de 29.8 ± 3.9 años y para el grupo II de 38.6 ± 2.8 años ($P = 0.0001$). Sin embargo, las concentraciones de FSH basales en el día 3 (6.1 ± 1.6 vs. 7.8 ± 4.1 mU/ML), LH (5.4 ± 3.4 vs. 3.8 ± 1.3 mU/ML) e índice de masa corporal (25.1 ± 5.4 vs. 22.9 ± 1.4 Kg/m²) no muestran diferencia significativa entre el grupo I y II respectivamente.

Al finalizar el ciclo de estimulación ovárica, los resultados mostraron una concentración mayor de estradiol para el grupo de pacientes menores de 35 años (4811.2 ± 2729.5 vs. 2932.5 ± 1827.1) y el número de óvulos fertilizables fue directamente proporcional en este grupo (8.6 ± 5.2 vs. 3.0 ± 2.5) expresado en el proceso de fertilización.

Se hace evidente que la concentración de leptina a través del ciclo de estimulación controlada es significativamente mayor en pacientes del grupo II (> 35 años) relacionándose directamente con los procesos de fertilización antes mencionados, los cuales son vistos en la tabla 3.

Discusión

El presente estudio fue aplicado a una población selecta de pacientes que cursaban con infertilidad y que contaban con indicación para fertilización In-Vitro. Las características demográficas para este estudio fueron muy similares por su planteamiento inicial, sin embargo dos grupos de estudio fueron seleccionados (pacientes menores y mayores de 35 años de edad) interpretado esto como el grupo de pacientes que tendrán mejor respuesta a la inducción de evolución (< 35 años), comparada con aquellas en donde su respuesta será menor (> 35 años).

Durante la fase de desarrollo folicular cada óvulo en crecimiento dependerá de características en su microambiente muy específicas que están directamente relacionadas a la presencia de factores tanto sistémicos como locales y que tendrán una influencia directa o indirecta en su desarrollo. Uno de estos factores es la presencia de leptina, la cual ha sido correlacionada tanto con la calidad embrionaria (Barroso *et al*; 1999), y el éxito en los tratamientos de fertilización In-Vitro (Mantzoros *et al*; 2000). Diversos estudios han mostrado una relación directa entre el índice de masa corporal y la expresión de la leptina sérica (Gurbuz *et al*; 2005) al mismo tiempo que se ha propuesto una correlación negativa entre la leptina con tasas de implantación y embarazo en pacientes sometidas a fertilización In-Vitro (Anifandis *et al*; 2005).

Es conocido que la leptina posee una influencia en la condición reproductiva actuando a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y en forma directa sobre el ovario y el endometrio (Caprio *et al*; 2001, Moschos *et al*; 2002). Los receptores para leptina, tiene tanto tejido ovárico como endometrial confirmando de esta manera la importancia de la leptina como un regulador local en la función ovárica y endometrial (Karlsson *et al*; 1997).

Es interesante observar que en el presente estudio la variación en la concentración de leptina, tanto sérica como folicular tiene una expresión marcada dependiendo de la edad, en donde pacientes en condiciones de reserva ovárica similar (FSH, LH y estradiol en el día 3 del ciclo iniciado)

mostraron una concentración significativamente menor. De este mismo modo Gurbuz y colaboradores relacionaron no solo una disminución en la concentración final de estradiol, sino también en el número de óvulos obtenidos a través de estas técnicas de reproducción asistida. En este estudio pudimos observar que tanto la concentración máxima de estradiol y el número de óvulos maduros al final de la estimulación ovárica fueron menores en aquellas pacientes por arriba de los 35 años y al mismo tiempo tuvo una expresión directa sobre la tasa de fertilización.

La consistencia en los resultados obtenidos a través de este estudio son similares a los ya previamente reportados en la literatura, de tal manera que se hace necesario el entendimiento de los procesos intrafoliculares relacionados con la expresión de este péptido para entender su efecto no solo en la estimulación ovárica sino en la expresión final de todas estas técnicas expresadas a través del embarazo.

En conclusión podemos decir que la expresión de la leptina puede servir como marcador de respuesta ovular y desarrollo embrionario relacionado directamente a estos factores de expresión folicular y que pudieran tener un valor predictivo en los resultados de fertilización In-Vitro.

Tabla 1. Características demográficas por grupo de edad

Variable	≤ 35 años	> 35 años	P
Edad	29.8 ± 3.9	38.6 ± 2.8	0.0001
FSH (mU/ML)	6.1 ± 1.6	7.8 ± 4.1	NS
LH (mUI/ML)	5.4 ± 3.4	3.8 ± 1.3	NS
IMC (Kg/m²)	25.1 ± 5.4	22.9 ± 1.4	NS

Tabla 2. Características de la estimulación ovárica

Variable	≤ 35 años	> 35 años	P
Grosor endometrial	11.1 ± 2.3	11.6 ± 1.8	NS
Concentración máxima de estradiol	4811.2 ± 2729.5	2932.5 ± 1827.1	0.07
Día de la hGC	13 ± 0.7	14.1 ± 1.1	NS
Número de óvulos maduros	9.9 7.2	3.7 ± 3.7	0.02
Número de óvulos inmaduros	4.0 ± 2.7	4.3 ± 3.3	NS
Óvulos fertilizados (2 PN)	8.6 ± 5.2	3.0 ± 2.5	0.005

Tabla 3. Evaluación en la concentración sérica y en líquido folicular de leptina

Variable	≤ 35 años	> 35 años	P
Leptina d₃	0.04 ± 0.05	0.11 ± 0.10	0.04
Leptina d_{hGC}	0.06 ± 0.04	0.22 ± 0.25	0.05
Leptina en LF	0.03 ± 0.02	0.07 ± 0.12	NS

Bibliografia

Anifandis G, Koutselini E, Louridas K, Liakopoulos V, Leivaditis K, Mantzavinos T, Sioutopoulou D, Vamvakopoulos N. Estradiol and leptin as conditional prognostic IVF markers. *Hum Reprod* 2005, vol. 129 No. 4. pp. 531-534

Antczak M, Van Blerkom J, Clark A. A novel mechanism of vascular endothelial growth factor, leptin and transforming growth factor-B2 sequestration in a subpopulation of human ovarian follicle cells. *Hum Reprod* 1997, vol. 12 No. 10. pp. 2226-2234

Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, Grahan L, Danforth D, Huey S, Abuhamad A, Oehinger S. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril* 1999, vol. 16 pp. 1024-1026

Bützow T, Moilanen J, Lehtovirta M, Tuomi T, Hovatta O, Sieberg R, Nilson C, Apter D. Serum and Follicular Fluid Leptin during in Vitro Fertilization: Relationship among Leptin Increase, Body Fat Mass, and Reduced Ovarian Response. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, vol. 84 No. 9 pp. 3135-3139

Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2001, vol. 12 pp. 65-72

Chehab F, Lom M, Lu R, Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Gene* 1996, vol. 12 pp. 318-320

Clément K, Vaisser C, Lahlou N. et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998, Vol. 392 pp. 398-401

Cioffi J, Van Blerkom J, Antczak M. et al. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997, vol. 2 pp. 467-472

Cunningham M, Clifton D, Steiner R. Leptin's actions on the reproductive axis; perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 1999, vol. 60 pp. 216-222

Frunhbereck G, Jebb S, Prentice A. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 1998, vol. 18 pp. 399-419

González R, Simón C, Caballero P, Norman Robert, Chardonnens D, Devoto L, Bischof P. Letin and reproduction. *Hum Reprod* 2000, vol. 6 No. 3 pp. 290-300

Gurbuz B, Yalti S, Ficioglu C, Tasdemir S. The relation of serum and follicular fluid leptin and ovarian steroid levels in response to induction of ovulation in vitro fertilization cycles. *Eur J Obstet Gynecol reprod Biol* 2005, vol. 118 No. 2 pp. 214-218

Hoggard N, Hunter L, Trayhurn P et al. Leptin and reproduction. *Proc Nutr Soc* 1998, vol. 57 pp. 421-427

Hartshorne GM. Preovulatory follicular fluid: Relationships to ovarian stimulation protocol, fertilization, and sperm penetration in vitro. *Fertil Steril* 1989, vol. 52 No. 6 pp. 998-1005

Huey S, Abuhamad A, Barroso G, Hsu MI, Kolm P, Mayer J, Oehninger S. Perifollicular blood flow doppler indices, but no follicular pO₂, pCO₂, or pH, predict oocyte developmental competence in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999, vol. 72 No. 4 pp. 707-712

Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS, Carlsson B. expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, vol. 82 pp. 4144-4148

Korbonits M, Trainer P, Little J. et al. Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. Clin Endocrinol 1997, vol. 46 pp. 751-757

Licinio J, Negartilde A, Mantzoros C et al. Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. Proc Natl Acad Sci USA. 1998, vol. 95 pp. 2541-2546

Mannucci E, Ognibene A, Becorpi A, et al. Relationship between leptin and estrogens in healthy women. Eur. J. Endocrinol. 1998, vol. 139 pp. 198-201

Mantzoros CHS, Cramer DW, Liberman RF, Barbieri RL. 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, 2000, vol. 15 pp. 539-544

Messinis I, Milingos S, Zikopoulos K et al. Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles superovulated with follicle stimulating hormone. Hum Reprod 1998, vol. 13 pp. 1152-1156

Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. Fertil Steril 2002 vol. 77 pp. 433-444

Nargund G, Bourne T, Doyle P, Parsons J, Cheng W, Campbell S, Collins W. Associations between ultrasound indices of follicular blood flow oocyte recovery and preimplantation embryo quality. Hum Reprod 1996, vol. 11 No. 1 pp. 109-113

Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N et al, Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in generally obese Zucker fatty (fat/fat) rats. J Clin Investig. 1995, vol. 96 pp. 87-94

Strobel A, Issad T, Camoin L et al. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Gene* 1998, vol. 18 pp. 213-215

Unkila-Kallio L, Andersson S, Koistinen H, Karonen S, Ylikorkala O, Tiitinen A. Leptin during assisted reproductive cycles: the effect of ovarian stimulation and of very early pregnancy. *Hum Reprod* 2001, vol. 16 No. 4 pp. 657-662

Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: Association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997, vol. 12 No 12 pp. 1047-1055

Van Blerkom J. Epigenetic influences on oocyte developmental competence: Perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *J assist Reprod Genet* 1998, vol. 15 No 5 pp. 226-234

Zachow R, and Magoffin D. Direct intraovarian effects of leptin: Impairment of the synergistic action of insulin-like grow factor- I on follicle-stimulating hormone dependent estradiol 17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinol.* 1997, vol.138 pp. 847-850

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994, vol. 372 pp. 425-432