medigraphic Artemisa en línea

Artículo original

ANALES MEDICOS

Vol. 51, Núm. 1
Ene. - Mar. 2006
pp. 5 - 10

Expresión sérica e intrafolicular de la concentración de leptina como marcador en las características del desarrollo ovocitario

Vivian Cruz,* Clara Corona,** Alejandro Avendaño,*** Gerardo Barroso***

RESUMEN

Objetivo: Evaluar las condiciones de madurez ovular y desarrollo embrionario a partir de la concentración sérica e intrafolicular de leptina. **Material y método:** Estudio prospectivo y observacional. Fueron incluidos un total de 30 ciclos de estimulación ovárica controlada para procedimientos de fecundación *in vitro*/inyección intracitoplasmática del espermatozoide (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 hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (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 gonadotropina coriónica humana (hGC) los cuales mostraron significancia estadística ($p < 0.05$). **Conclusión:** Pacientes mayores de 35 años de edad llevadas a ciclos de estimulación ovárica presentan concentraciones más elevadas de leptina sérica e intrafolicular relacionadas con una concentración baja de estradiol, en donde esta condición de contrarregulación 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 clave: Leptina, líquido folicular, fecundación *in vitro*, FIV, inyección intracitoplasmática del espermatozoide, ICSI.

ABSTRACT

Objective: *To determine the conditions of egg maturity and embryonic development serum and intrafollicular concentration of leptine.* ***Material and methods:*** *Prospective and observational study. A total of 30 cycles of controlled ovarian hyperstimulation of IVF/ICSI procedures were included, where concentration of leptine in serum and intrafollicular fluid was measured. This measure was made from individual follicles during the egg retreival where fertilization characteristics were evaluated.* ***Results:*** *During a controlled ovarian hyperstimulation cycle of 30 patients, divided in two groups of ages (< 35 y/o and > 35 y/o), there were no differences on base serum levels of FSH, LH and IMC by study design between groups. There exists a directly proportional relation between the high levels of serum estradiol and the quantity of fertilized ova in patients < 35 y/o which respectively correlates with a lower concentration of leptine in day 3 of the menstrual cycle and day of application of hGC that demonstrated statistics significance ($P < 0.05$).* ***Conclusions:*** *Patients > 35 y/o underwent ovarian hyperstimulation cycles, showed higher concentrations of serum and intrafollicular leptine related to a low concentration of estradiol, where this condition of intrafollicular contraregulation is expressed by a lower number of fertilized ova and reduction on ovum quality, possibly requiring a higher amount of r-FSH for its stimulation.*

Key words: *Leptine, follicular fluid, IVF, ICSI.*

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 en-

* Servicio de Ginecología y Obstetricia, Centro Médico ABC.
** Dirección General, Clínica Lomas Altas.
*** Centro Médico ABC.

Recibido para publicación: 08/03/06. Aceptado para publicación: 22/03/06.

Correspondencia: **Dra. Vivian Patricia Cruz Minoli**
Teya núm. 94, Col. Héroes de Padierna, 14200 México, D.F.
E-mail: vivianminoli@yahoo.com

medigraphic.com

zimas esteroidogénicas a través de vías de transcripción para genes específicos.

La foliculogénesis ovárica está sustentada por la interacción endocrino-paracrina para la maduración ovocitaria, en la cual exista un adecuado desempeño de los mecanismos intracelulares entre células de la teca, granulosa y factores metabólico/regulatorios que se encuentran presentes en el líquido folicular. Este sistema de regulación intrafolicular está compuesto por diversas sustancias, las cuales incluyen factores de crecimiento, citoquinas, neuropéptidos y moléculas vasorreguladoras. La homeostasis folicular permite el desarrollo de óvulos sanos, fertilizables con una adecuada luteinización y que dependen de una relación estricta entre moléculas de regulación y proteínas de orden angiogénico.[1]

El concepto de competencia ovular bajo el entorno de la arquitectura vascular perifolicular ha sido previamente descrito en la transferencia de embriones provenientes de folículos en forma individual.[2] 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 biometabólicos, disolución en el contenido de O_2/CO_2, pH, factores de crecimiento y proteínas reguladoras) ha 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.[3-5]

Huey y colaboradores 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 desarrollo folicular ovárico, en ciclos de inducción de la ovulación, muestra una expresión única caracterizada por diferencias cualitativas y cuantitativas tanto de hormonas esteroideas,[6] proteínas,[4] y en el contenido de oxígeno disuelto.[2] La capacidad esteroidogénica de las células de la granulosa y del cúmulos *oophorus*, incluyen una secreción de diversos factores de crecimiento.

Recientemente, se han identificado ciertos factores relacionados con 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), el cual se encarga de promover la expansión celular endotelial y formación vascular.[2] Por otro lado, se ha observado que la leptina actúa como una proteína moduladora involucrada en diversas actividades metabólicas y de orden reproductivo.[7-8] Aunque la función de los genes de activación de la leptina folicular no ha sido determinada, la esteroidogénesis ovárica[7] y la preparación del endometrio para la implantación ha sido sugerida anteriormente.[8]

Características bioquímicas de la leptina

La leptina es un polipéptido no glicosilado de 146 aminoácidos, producido por el gen de activación *ob*, la cual fue descrita en 1994.[9] 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 cual es secretada predominantemente por el tejido adiposo. Existe una relación entre la concentración plasmática de leptina y el adecuado estado nutricional para la función reproductiva.[10]

Múltiples investigaciones han demostrado la participación de dicha hormona en la patología de diferentes enfermedades, entre las que se encuentran: obesidad, anorexia nerviosa, diabetes mellitus, síndrome de ovario poliquístico, enfermedades inmunes adquiridas, cáncer, síndrome de Cushing y deficiencia de hormona del crecimiento.[11]

La relación existente entre la expresión del gen *ob* como familia de las citoquinas y la hipófisis anterior, se relaciona 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.[12]

Sistemas de retroalimentación para la expresión de leptina

La leptina actúa como regulador de la función hipotálamo-hipófisis-ovario, siendo ésta un indicador metabólico del eje reproductivo en primates, donde la leptina incrementa la concentración plasmática de hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH); así como la amplitud y la frecuencia de los pulsos de LH.[13] La administración de FSH induce incrementos paralelos de concentración en suero de estrógenos y leptina.[14,15]

Señalización de los procesos reproductivos a través de la leptina

La leptina actúa como señal periférica en el estado nutricional que se requiere para la función reproductiva, ya que bajas concentraciones plasmáticas de ésta indican estados inadecuados de nutrición, 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.[16]

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.[17]

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.[18]

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.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo, observacional y aleatorizado 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 foliculoestimulante (FSH), hormonal luteinizante (LH) y estradiol (E_2). Pacientes con FSH > 10 mUI/mL por estudio de quimioluminiscencia fueron excluidas del análisis. Pacientes con relación FSH/LH de uno o mayor (sugestivo de síndrome de ovario poliquístico) fueron también eliminadas del estudio. Por consiguiente, se seleccionó una población homogénea de mujeres 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 aleatoria.

Protocolo de inducción de la ovulación

Todas las pacientes fueron suprimidas con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (aGnRH),* utilizando el protocolo largo de fase lútea media para la supresión hipotálamo-hipofisiaria. La GnRH fue iniciada en la fase lútea media previa al ciclo estimulado a una dosis de 0.5 mg/día y reduciendo a 0.25 mg/día al iniciar el primer día del ciclo menstrual, el cual se continuó hasta la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG). Las pacientes recibieron FSH recombinante** a partir del tercer día del ciclo menstrual con una dosis de 300 UI. La dosis del medicamento fue ajustada en forma individual para cada una

* Lucrin®, Laboratorios Abbot, Ciudad de México.
** Gonal-F®, Laboratorios Serono de México, Ciudad de México.

de las pacientes, utilizando el protocolo de disminución escalonada de la dosis *(step-down)*. Cuando se observó un mínimo de tres folículos > 18 mm a través de seguimiento folicular, se administraron 250 μg 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 después de 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* convencional o mediante inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).

El desarrollo embrionario se llevó a cabo utilizando un medio de cultivo (P1) hasta obtener de seis a ocho 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 coriónica 12 días posteriores a la transferencia embrionaria. El embarazo clínico fue definido como la presencia de saco gestacional detectado mediante ultrasonido dentro de las cinco a siete semanas de gestación.

Determinación y medición de la concentración de leptina

La toma y determinación de la muestra de leptina sérica se llevó a cabo el día tres y el día de la aplicación de la hGC del ciclo estimulado; *a posteriori* durante la aspiración folicular se determinó la concentración de leptina folicular utilizando un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA donde la concentración de leptina es determinada por una curva estándar, usando un valor promedio de absorbancia de 0.1 pg/mL. Los coeficientes de variabilidad fueron menores a 5%.

Evaluación estadística

De acuerdo con la distribución en la población de estudio, fueron utilizadas pruebas paramétricas. 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 ± 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/m^2) 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 (4,811.2 ± 2,729.5 *vs* 2,932.5 ± 1,827.1) 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 *(Cuadro I)*.

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 presentados en el *cuadro II*.

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

Cuadro I. 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	4,811.2 ± 2,729.5	2,932.5 ± 1,827.1	0.07
Día de ovulación	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

hGC = Gonadotropina coriónica humana. NS = No significativa.

de evolución (< 35 años), comparada con aquéllas en las que 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 con 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[19] como con el éxito en los tratamientos de fertilización *in vitro*.[20] Diversos estudios han mostrado una relación directa entre el índice de masa corporal y la expresión de la leptina sérica,[21] 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*.[22]

Es conocido que la leptina posee una influencia en la condición reproductiva al actuar a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y en forma directa sobre el ovario y el endometrio.[23-24] Los receptores para leptina tienen tanto tejido ovárico como endometrial, lo que confirma la importancia de la leptina como un regulador local en la función ovárica y endometrial.[25]

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. Gurbuz y colaboradores relacionaron no sólo 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 la concentración máxima de estradiol y el número de óvulos maduros al final de la estimulación ovárica fueron menores en aquellas pacientes mayores de 35 años y al mismo tiempo tuvo una expresión directa sobre la tasa de fertilización.

Cuadro II. Evaluación en la concentración sérica y en líquido folicular (LF) de leptina.

Variable	≤ 35 años	> 35 años	p
Leptina d_3	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

NS = No significativa.

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 comprender su efecto no sólo en la estimulación ovárica, sino también 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*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bützow T, Moilanen J, Lehtovirta M, Tuomi T, Hovatta O, Siegberg 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; 84 (9): 3135-3139.
2. 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; 12 (12): 1047-1055.
3. Van Blerkom J. Epigenetic influences on oocyte developmental competence: Perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *J assist Reprod Genet* 1998; 15 (5): 226-234.
4. 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; 11 (1): 109-113.
5. Huey S, Abuhamad A, Barroso G, Hsu MI, Kolm P, Mayer J, Oehninger S. Perifollicular blood flow doppler indices, but no follicular pO_2, pCO_2, or pH, predict oocyte developmental competence *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1999; 72 (4): 707-712.
6. Hartshorne GM. Preovulatory follicular fluid: Relationships to ovarian stimulation protocol, fertilization, and sperm penetration *in vitro*. *Fertil Steril* 1989; 52 (6): 998-1005.
7. 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; 12: 318-320.
8. 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; 2: 467-472.
9. Zhang Y, Proenca R, Maffei M et al. Possitional cloning of the mouse obse gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.
10. Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N et al. Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gen expression in generally obese Zucker fatty (fat/fat) rats. *J Clin Investig* 1995; 96: 87-94.
11. Frunhbereck G, Jebb S, Prentice A. Leptin: Physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 1998; 18: 399-419.
12. Cunningham M, Clifton D, Steiner R. Leptin´s actions on the reproductive axis; perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 1999; 60: 216-222.
13. 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; 95: 2541-2546.
14. Mannucci E, Ognibene A, Becorpi A et al. Relationship between leptin and estrogens in healthy women. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 198-201.
15. 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; 13: 1152-1156.
16. Korbonits M, Trainer P, Litle 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; 46: 751-757.
17. Gonzalez R, Simon C, Caballero P, Norman R, Chardonnens D, Devoto L, Bischof P. Leptin and reproduction. *Hum Reprod* 2000; 6 (3): 290-300.
18. 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; 16 (4): 657-662.
19. 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; 16: 1024-1026 .
20. 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; 15: 539-544.
21. 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 vitro* fertilization cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 118 (2): 214-218.
22. 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; 129 (4): 531-534.
23. Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 65-72.
24. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 2002 (77): 433-444.
25. 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 Endocrynol Metab* 1997; 82: 4144-4148.

edigraphic.com