

Importancia del estado nutricional, los niveles de grelina y el IMC como factores predictivos de embarazo en un programa de FIV (fertilización in vitro)

Importance of nutritional status, Ghrelin levels and BMI, as predictive factors of pregnancy, in an IVF program

Dr. Luciano Sabatin, Dr. Edgardo Young (b), Dr. Roberto Inza, Dr. Dante Paz, Dr. Guillermo Marconi y Dr. Eduardo Lombardi

Instituto de Ginecología y Fertilidad, IFER, Buenos Aires, Argentina.

ifer@iffer.com.ar, lsabatinibeck@hotmail.com

Resumen

Objetivo: establecer la correlación entre los niveles séricos de grelina y los hallados en fluido folicular, el IMC, y los niveles séricos de estradiol y progesterona. Establecer la asociación entre los niveles plasmáticos de grelina y los resultados reproductivos en cuanto a tasa de embarazo.

Diseño: estudio prospectivo de cohortes.

Materiales y métodos: se incluyeron para el análisis los procedimientos de alta complejidad realizados entre junio y diciembre de 2007 (n= 492). Todas las pacientes tuvieron un IMC menor de 26 kg/m², ritmos menstruales conservados, FSH basal menor de 12 mUI/ml y edad menor de 40 años. Se excluyeron los ciclos con síndrome de ovario poliquístico y/o insulinoresistencia, antecedente de falla previa de fertilización in vitro o ciclos con muestras de espermatozoides provenientes de biopsia de testículo. El grupo de estudio (Grupo A) fue definido por aquellas pacientes con un IMC menor de 20 kg/m² y se logró incluir un total de 19 ciclos. El grupo control (Grupo B) quedó definido por ciclos con IMC entre 20-25 kg/m²; los ciclos del grupo B fueron seleccionados de los realizados en el mismo día del grupo A en una relación 1:1. De una muestra tomada en el día de la punción ovárica, se realizó el dosaje sérico de grelina, estradiol y progesterona; se utilizó el fluido folicular del primer folículo aspirado libre de medio de lavado. Se evaluó causa de esterilidad, FSH basal, IMC, ovocitos captados, ovocitos metafase II (M II), ovocitos fertilizados, calidad embrionaria, tasas de implantación y embarazo.

Resultado: se halló una correlación positiva entre los niveles séricos de grelina y fluido folicular (r= 0,72, p<0,05), así como una correlación indirecta significativa entre los niveles de grelina y estradiol y progesterona (r= -0,44 y r= 0,43 respectivamente, ambos con p<0,05). No se hallaron diferencias significativas en cuanto a la edad, % esterilidad primaria, causa de esterilidad y FSH basal. Tampoco se observaron diferencias

en la tasa de ovocitos captados, proporción de MII captados o calidad embrionaria. Se hallaron diferencias significativas en los niveles de grelina entre ambos grupos (Grupo A: 2,38 ± 0,63 ng/ml; Grupo B: 0,47 ± 0,24 ng/ml, p<0,05); de estradiol (Grupo A: 823,52 ± 501,54 pg/ml; Grupo B: 1317,35 ± 661,59 pg/ml, p<0,05) y progesterona (Grupo A: 9,8 ± 5,85 ng/ml; Grupo B: 17,04 ± 10,14 ng/ml, p<0,05). Todas las pacientes con IMC bajo (Grupo A) tuvieron niveles séricos de grelina mayores a 1 ng/ml y todas las pacientes del grupo control tuvieron niveles de grelina menores o iguales a 1 ng/ml. No se hallaron diferencias en la tasa de implantación (Grupo A: 12%, 7/54; Grupo B: 33%, 18/54), aunque sí se halló una diferencia significativa en la tasa de embarazo (Grupo A: 26%, 5/19; Grupo B: 65%, 13/20, p<0,05).

Conclusión: la causa de una escasa respuesta ovárica y resultados reproductivos bajos en pacientes con IMC bajo sería múltiple. Los niveles elevados de grelina se correlacionan linealmente con un IMC bajo, y se observó que un nivel mayor de 1 ng/ml de grelina sería característico de este grupo. Se ha postulado que los niveles elevados de grelina se asocian con bajos niveles de estradiol y progesterona y menor tasa de embarazo, en forma similar a lo observado aquí. Se desconoce cuál es el rol final de la grelina, aunque se ha postulado que su rol sería el de impedir el desarrollo de un embarazo en un organismo que no se encuentra en plena condición para llevarlo adelante. Finalmente, los niveles séricos de esta citoquina representan satisfactoriamente la producción local gonadal.

Palabras clave: grelina, IMC, fluido folicular, FIV, estradiol, progesterona.

Abstract

Objective: To establish the correlation between ghrelin serum levels with those found in follicular fluid, BMI, estradiol and progesterone serum levels. Secondly

the association between plasmatic levels of ghrelin and reproductive outcome in terms of pregnancy rate were established.

Design: Prospective cohort study.

Materials and Methods: Assisted reproductive cycles performed between June and December 2007 were included for the analysis (n= 492). All patients had a BMI lower than 26 kg/m², regular menstrual cycles, basal FSH levels <12 mIU/ml and were younger than 40 years. Patients with PCOS and/or insulin resistance, previous in vitro fertilization failure o cycles requiring testicular biopsy were excluded. The study group (Group A) was composed of 19 cycles with patients whose BMI was <20 kg/m². The control group (group B) was defined by those patients performing IVF with a BMI between 20-25 kg/m²; and the cycles selected were those performed on the same day of the cycles under study on a 1:1 proportion. Ghrelin, estradiol and progesterone serum levels were obtained on the day of ovum pick-up; and the fluid from the first aspirated follicle from each ovary was preserved as well. The following parameters were considered: cause of infertility, BMI, basal FSH levels, oocyte recovered, mature oocytes (metaphase II, MII), fertilized oocytes, embryo quality, implantation and pregnancy rate.

Results: There was a positive correlation between serum and follicular ghrelin levels ($r= 0,72$, $p<0,05$), and an inverse correlation between serum ghrelin and estradiol and progesterone levels ($r= -0,44$ and $r= 0,43$ respectively, both with a $p<0,05$). No significant differences were found between age, cause of infertility, type of infertility (primary/secondary) and basal FSH. Also no differences were found between total number of oocytes, proportion of mature oocytes or embryo quality. There were statistically significant levels between groups in ghreline levels (Group A: $2.38 + 0.63$ ng/ml; Group B: $0.47 + 0.24$ ng/ml, $p<0.05$); estradiol levels (Group A: $823.52 + 501.54$ pg/ml; Group B: $1317.35 + 661.59$ pg/ml, $p<0.05$) and progesterone (Group A: $9.8 + 5.85$ ng/ml; Group B: $17.04 + 10.14$ ng/ml, $p<0.05$). All patients with low BMI (group A), had serum ghrelin levels <1 ng/ml, and all patients with higher BMI (group B) had serum ghrelin levels of 1 ng/ml or lower. No significant differences in implantation rate were found (Group A: 12%, 7/54; Group B: 33%, 18/54), though a statistically significant difference was found in the pregnancy rate (Group A: 26%, 5/19; Group B: 65%, 13/20, $p<0.05$).

Conclusions: There are multiple causes of a low ovarian response and poor reproductive outcome in patients with low BMI. High levels of circulating ghrelin correlate with a low BMI, being its level typically higher than 1 ng/ml in this group. It has been described

elsewhere that high levels of ghrelin usually present low estradiol and progesterone levels, as well as lower pregnancy rates as shown in this paper. The ultimate rol of ghreline, though still unknown, may be to avoid pregnancy to occur in patients with suboptimal physical condition. Finally, serum levels of this cytokine clearly correlate and represent local gonadal production.

Introducción

Desde hace tiempo ya, la bibliografía describe a nivel mundial la relación que existe entre el estado nutricional y la función reproductiva¹. De hecho la mujer presenta mayores reservas de tejido adiposo que el hombre, destinadas a ser utilizadas durante el embarazo².

Tanto en estados de déficit de peso como así también en los casos de exceso, el organismo se vale de mecanismos que intentan impedir la gestación, ya que de producirse, ésta se transformaría en un embarazo de alto riesgo materno-fetal debido al estado metabólico alterado de estas pacientes³.

Con el avance de la medicina, muchos de estos mecanismos se han aclarado y es así como hoy se habla de la relación que existe entre la obesidad-leptina y reproducción, o bien de cómo el hiperinsulinismo repercute en el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal; pero es poco lo que se conoce acerca de los mecanismos intervinientes en pacientes que presentan bajo peso^{3,4}.

Hace poco más de 9 años se descubrió una nueva citoquina capaz de unirse y estimular los receptores de la hormona de crecimiento, de allí esta hormona hereda el nombre de grelina⁵. La grelina es un péptido de 28 aminoácidos que es secretada principalmente por el estómago y el intestino delgado⁵⁻⁷.

Desde su descubrimiento, comenzó a estudiarse la relación que existe entre esta citoquina y la regulación de numerosas funciones endocrinas y paracrinas⁵. De hecho la grelina no solo muestra una fuerte interacción con la hormona de crecimiento, sino que también tiene una importante asociación con la ingesta de alimentos y el balance energético⁸.

Se conocen en la actualidad 2 tipos de receptores de grelina, que se encuentran ampliamente distribuidos en todo el organismo: intestino, páncreas, riñón, placenta, tejidos linfáticos, gónadas, tiroides, suprarrenal, pulmón, hipófisis e hipotálamo^{5,6}.

Desde el punto de vista energético, esta citoquina posee acciones totalmente antagónicas a las de la leptina, por eso sus niveles plasmáticos son bajos en aquellas pacientes con obesidad y síndrome de ovario poliquístico (SOP) y, por el contrario, se encuentran muy elevados en aquellas mujeres que tienen un IMC disminuido⁹. Sobre

la base de su acción como modulador del metabolismo energético y la estrecha relación que existe entre el estado nutricional y la función reproductiva, se ha comenzado a estudiar el control local o sistémico de la grelina sobre el eje gonadal.

Al parecer, las concentraciones elevadas de esta hormona repercutirían negativamente a lo largo del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal¹⁰.

Se ha comprobado que la grelina en concentraciones elevadas altera la pulsatilidad de la secreción de GnRh a nivel hipotalámico, regula la secreción de LH y, en menor medida, de FSH en la hipófisis¹¹. A nivel ovárico, los receptores de grelina presentan un patrón de expresión característico: es máximo durante la fase media y lútea del ciclo menstrual. Ghizzoni y cols. demostraron in vitro cómo esta citoquina repercutía negativamente en la esteroideogénesis ovárica¹². A nivel endometrial, guarda un patrón de expresión similar al ovárico, es decir, su expresión es máxima durante el período de ventana, cumpliendo un aparente rol en la formación del endometrio decidual¹³. Los niveles elevados no repercutirían solo en la mujer, en el hombre alteran la producción y secreción de testosterona¹⁴ y en embriones de ratones, producen una inhibición del desarrollo embrionario, disminuyendo el número de células del citotrofoblasto y del macizo celular interno¹⁵.

Los avances en el conocimiento de esta hormona han permitido plantear que la elevación de la grelina sería uno de los mecanismos con los que cuentan los seres vivos para impedir que se produzca un embarazo en pacientes que orgánicamente no estarían preparadas para poder llevarlo adelante⁹.

Objetivos

El objetivo principal de nuestro trabajo fue comparar la relación que existe entre los niveles plasmáticos de grelina y el IMC con los resultados reproductivos de pacientes que realizaron tratamientos de alta complejidad en nuestro instituto.

El objetivo secundario fue correlacionar los niveles plasmáticos de grelina con los de líquido folicular.

Diseño: estudio prospectivo, descriptivo.

Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado antes de iniciar la hiperestimulación ovárica controlada, y el trabajo fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética del IFER.

Materiales y métodos

Se analizaron 492 procedimientos de alta complejidad realizados en el IFER, entre el 5/6/07 y el

28/12/07. Se reclutaron así 39 pacientes que cumplieron con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

1. Indicación de un tratamiento de alta complejidad, sea FIV o ICSI.

2. IMC <26.

3. Ritmos menstruales conservados.

4. FSH basal <12.

5. Edad <40 años.

Criterios de exclusión:

1. Factor masculino severo.

2. Síndrome de ovario poliquístico o insulinorresistencia.

3. Antecedente de falla previa de fertilización in vitro.

Criterios de eliminación:

Se eliminaron del estudio pacientes con transfereencias embrionarias que no fueran clase A.

Protocolo de estimulación

Todas las pacientes utilizaron un protocolo flexible de antagonistas de la GnRh. Se administró FSHr (Gonal f®, Serono) en dosis de 200-300 UI/día subcutánea durante los 3 primeros días de estímulo, continuando con HMG (Menopur®, Ferring) en dosis de 225-300 UI/día subcutánea. Cuando el tamaño folicular alcanzaba un diámetro promedio de entre 15-16 mm, se indicaba Cetrotide® (Serono) 0,25 UI/día subcutánea. Al hallar, mediante ecografía transvaginal, 2 o más folículos mayores a 18 mm se indicaba HCG (Gonacor®, Ferring) 10.000 UI subcutánea y se realizaba la captación ovular bajo anestesia, 34-36 h después.

Dosaje de grelina en plasma y líquido folicular

A todas las pacientes se les realizó una extracción de 5 cm³ de sangre venosa previo a la punción, que fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos. El plasma de todas las muestras se congeló a una temperatura de -5 °C para su posterior utilización.

Del mismo modo se centrifugó y congeló el líquido folicular libre de lavado, obtenido de la punción del folículo dominante.

Sobre el suero sanguíneo de todas las pacientes se realizó dosaje de estradiol y progesterona con kits de quimioluminiscencia prolongada (Johnson & Johnson®). Se midieron niveles de grelina en plasma y en líquido folicular con los Kits de ELISA (Phoenix Pharmaceuticals®, Belmont, CA, USA).

Procedimientos de laboratorio

Luego de la captación, los ovocitos fueron fertilizados mediante inseminación convencional o a través de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

La fertilización fue leída a las 16-18 h posteriores a la inseminación y fue considerada como normal solamente cuando se observaban los 2 pronúcleos en forma clara. Los embriones fueron mantenidos en cultivos P1 (Irving Scientific), suplementados con 5% de CO₂ y a 37 °C hasta el día 2 o 3, según correspondiera. La clasificación embrionaria realizada para elegir los embriones por transferir se basó en su apariencia morfológica microscópica.

Transferencia embrionaria y soporte de fase lútea

La transferencia embrionaria fue llevada a cabo en D2 o D3 según correspondiera, en todos los casos con guía ecográfica y con un mínimo de 2 h de retención de orina. En todos los casos se utilizaron catéteres soft tipo Frydman® quedando excluidas todas aquellas pacientes que presentaran dificultades técnicas al momento de realizarlo.

El soporte de fase lútea se realizó con progesterona micronizada (Utrogestan®, Ferring) 600 mg/día y ácido acetil-salicílico 125 mg/día hasta obtener el resultado en sangre de la subβ HCG y manteniéndola durante el primer trimestre en los casos de embarazo.

Análisis estadístico

Los datos estadísticos analizados incluyen: edad, IMC, etiología, FSH basal, número de folículos,

número de ovocitos captados, número de ovocitos metafase II, calidad embrionaria, promedio de embriones transferidos, tasa de implantación, de embarazo clínico, de aborto y de embarazo ectópico. El embarazo clínico fue definido mediante la visualización ecográfica de un embrión con latido cardíaco positivo.

El programa de estadística con el que se trabajó fue el STATA, utilizando el Student t-test, χ^2 y estudio de las dos proporciones, según correspondiera. Los resultados fueron considerados significativos cuando la $p < 0,05$.

Resultados

Las 39 pacientes que cumplían los criterios de inclusión fueron divididas en 2 grupos: Grupo A (19) presentaban un IMC < 19 ($16,57 \pm 1,01$) y Grupo B (20) con un IMC entre 20-25 ($23,15 \pm 2,03$). El tipo y la causa de infertilidad, como así también la edad, fueron comparables en ambos grupos, como se muestra en la Tabla 1.

En cuanto a los resultados reproductivos, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de FSH basal, número de ovocitos captados, número de ovocitos metafase II, tasa de fertilización y número de embriones transferidos, como se muestra en la Tabla 2.

La tasa de implantación, a pesar de no mostrar una diferencia desde el punto de vista estadístico, refleja una tendencia a favor del grupo de pacientes con un IMC normal (Grupo A 12% vs. 33% Grupo B). La tasa de embarazo clínico fue significativamente mayor en pacientes con peso normal (Grupo A 26% vs. 65% en Grupo B). La calidad embrionaria y el número de embarazos

	IMC < 19 (19)	IMC 20-25 (20)	P
Edad	34,05 (4,06)	33,65 (2,77)	NS
Esterilidad 1°	68% (13/19)	65% (13/20)	NS
Esterilidad 2°	32% (6/13)	35% (7/20)	NS
Etiología			
FTP	6	6	NS
EDT	7	6	NS
FM leve-mod.	3	5	NS
ESCA	2	2	NS
Otros	1	1	NS

Tabla 1

	IMC < 19 (19)	IMC 20-25 (20)	P
FSH basal	$6,47 \pm 1,30$	$6,8 \pm 1,43$	NS
Ovocitos captados	$12,94 \pm 5,94$	$13,5 \pm 5,95$	NS
Ovocitos MII	$8,42 \pm 3,33$	$9,25 \pm 4,67$	NS
Tasa fertilización	$6,36 \pm 2,92$ 75%	$7,4 \pm 2,83$ 80%	NS
Embriones transferidos	$2,84 \pm 0,76$	$2,85 \pm 0,48$	NS

Tabla 2

dobles no mostraron diferencias entre ambos grupos en estudio. La tasa de aborto fue mayor en el grupo de pacientes con IMC 20-25 (Grupo A 5% vs. 10% Grupo B) (TABLA 3).

En cuanto a los datos del laboratorio bioquímico, las pacientes con bajo peso presentaron valores de estradiol y progesterona, del día de la punción, significativamente menores a los hallados en pacientes con peso normal (Grupo A 823,52 y 9,8 vs. 1317,35 y 17,04 Grupo B).

Una mención especial merece el dosaje de grelina en plasma, que fue estadísticamente superior en aquellas pacientes con un IMC <19 comparado con el de las pacientes que tuvieron una IMC normal ($2,38 \pm 0,63$ vs. $0,47 \pm 0,24$ respectivamente) (Tabla 3).

Por último, se midió la grelina en el líquido folicular, libre de lavado, en 19 pacientes y se compararon sus resultados con los hallados en el plasma de las mismas pacientes: se constató que en el ovario los niveles son casi la mitad que en plasma (Tabla 4).

Discusión

La bibliografía mundial es muy extensa en la descripción de la alteración de parámetros reproductivos en pacientes obesas, pero es poco lo descripto acerca de las alteraciones que presentan pacientes muy delgadas en las que la grelina parece ser uno de los principales mediadores^{5,6}.

Ya en el año 1977, Frisch hacía mención de la importancia que tiene el estado nutricional en el ser humano¹. Este autor afirmaba que cuando se rompe este equilibrio metabólico, sea hacia el déficit o bien hacia el exceso, el propio organismo utiliza, a diferentes niveles, mecanismos que intentan impedir la concepción y el desarrollo de un embarazo^{1,2}. Es conocido también que la mujer, a diferencia del hombre, presenta el 10% más de tejido graso en la distribución de su peso corporal, justamente destinado a ser

utilizado para afrontar un estado hipermetabólico como lo es un embarazo². Además una adolescente requiere como mínimo el 17% de tejido graso para iniciar su menarca y el 22% para poder mantener sus ciclos menstruales de manera adecuada durante la edad reproductiva³. Todos estos datos reflejan la relación que existe entre el estado nutricional y la función reproductiva.

Con el avance estrepitoso de la ciencia, hoy podemos conocer y comprender algunos de aquellos mecanismos que hace 30 años Frisch comentaba; como lo es la leptina, el neuropéptido Y, el cortisol y la grelina entre los más importantes. La intención de nuestro trabajo fue poder describir lo que hallamos en 2 grupos de pacientes con diferente estado nutricional y que realizaron tratamientos de alta complejidad para lograr su embarazo.

Ya mencionamos en la introducción que la grelina es una hormona que se encuentra elevada en pacientes que presentan un IMC bajo y cómo esta elevación repercute en el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal^{5,6}. En concordancia con la bibliografía, el grupo de pacientes con menor peso presentó niveles de grelina estadísticamente superiores respecto del grupo con IMC 20-25. Además, este reporte demuestra por primera vez la presencia de esta citoquina en líquido folicular, ya que hasta ahora solo se suponía por la presencia de sus receptores en las diferentes células que componen el ovario. Ghizzoni y cols. describieron que los niveles progresivamente elevados de grelina, en un cultivo de células de la granulosa, provocaban una disminución de la secreción de estradiol y progesterona¹². En nuestro trabajo, observamos que las pacientes con un IMC <19 y que, por ende, tenían niveles más elevados de grelina, presentaron valores estadísticamente inferiores tanto de estradiol como de progesterona. A pesar de esta diferencia, la cantidad de ovocitos maduros captados en ambos grupos no alcanzó significación estadística.

Trabajando con embriones de ratones, cerdos y embriones partenotas, la literatura refleja que cuando esta

	IMC <19 (19)	IMC 20-25 (20)	P
Tasa implantación	12% (7/54)	33% (18/54)	NS
Tasa embarazo E	26% (5/19)	65% (13/20)	<0,05
Calidad embrionaria	Clase IV: 28% III: 46%	IV: 32% III: 49%	NS
Estradiol plasmático	823,52 ± 501,54	1317,35 ± 661,59	<0,05
Progesterona plasmática	9,8 ± 5,85	17,04 ± 10,14	<0,05
Grelina plasmática (ng/ml)	2,38 ± 0,63	0,47 ± 0,24	<0,05

Tabla 3

Grelina plasmática (19)	Grelina folicular (19)
1,58 ng/ml	0,63 ng/ml

Tabla 4

hormona se encuentra en niveles suprafsiológicos, inhibe el desarrollo embrionario, lo que disminuye el número de células tanto del macizo celular interno como del citotrofoblasto¹⁵. En nuestras pacientes, a pesar de observar una mejor calidad embrionaria en aquellas con un adecuado estado nutricional (81% vs. 74% de embriones de buena calidad), esta diferencia no fue significativa.

En cuanto a los mecanismos de implantación y embarazo, sin dudas la grelina tiene un papel relevante. Ya se describió el patrón de expresión que tienen sus receptores a nivel endometrial, el cual es máximo durante su período de ventana. En cultivos de células endometriales, la expresión del ARNm de la grelina se incrementa cuando las células estromales comienzan a transformarse en deciduales¹³. En nuestro grupo de pacientes con niveles más elevados de grelina, es decir, con IMC <19, la tasa de implantación fue menor (12% vs. 33%), esta diferencia no fue significativa debido claramente al número de pacientes del trabajo. No ocurrió lo mismo con la tasa de embarazo, donde las diferencias fueron ampliamente significativas entre los 2 grupos (Grupo A 65% vs. 26% Grupo B).

Conclusión

Probablemente la causa de los escasos resultados reproductivos en pacientes con bajo peso que realizan TRA no sea una sola. Sin lugar a dudas, existen muchos factores conocidos, como son los bajos niveles de leptina, las alteraciones en la secreción de la CRH, la alteración en el eje tiroideo, y muchos otros factores que probablemente se develarán en el futuro. Creemos que la grelina, debido al importante rol que cumple en la homeostasia energética del organismo y su relación con la función reproductiva, sería uno de los tantos mediadores que intentarían impedir el desarrollo de un embarazo en aquellos estados donde el organismo no se encontraría en condiciones de llevarlo a cabo, tal como Frisch lo mencionó hace ya 30 años.

Bibliografía

1. Bouchard C, Tremblay A, Leblanc C, Lortie G, Savard R, Theriault G. A method to assess energy expenditure in children and adults. *Am J Clin Nutr* 1983; 37:461-7.
2. Bolumer F, Olsen J, Rebagliato M, Saez-Lloret I, Bisanti L. Body mass index and delayed conception: a European multicentre study on infertility and subfertility. *Am J Epidemiol* 2000; 151:1072-9.
3. Zaadstra BM, Seidell JC, Van Noord PA, te Velde ER, Habbema JD, Vrieswijk B, Karbaat J. Fat and female fecundity: prospective study of effect of body fat distribution on conception rates. *BMJ* 1993; 306:484-7.
4. Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Short F, Anyaoku V, Reed MJ, Franks S. Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1992; 36:105-11.
5. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402:656-60.
6. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4753-8.
7. Leidy HJ, Williams NI. Meal energy content is related to features of meal-related ghrelin profiles across a typical day of eating in non-obese premenopausal women. *Horm Metab Res* 2006; 38:317-22.
8. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50:1714-9.
9. Budak E, Fernández Sánchez M, Bellver J, Cerveró A, Simón C, Pellicer A. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil Steril* 2006; 85:1563-81.
10. Schneider LF, Warren MP. Functional hypothalamic amenorrhea is associated with elevated ghrelin and disordered eating. *Fertil Steril* 2006; 86:1744-9.
11. Vulliamoz NR, Xiao E, Xia-Zhang L, Germond M, Rivier J, Ferin M. Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5718-23.
12. Viani I, Vottero A, Tassi F, Cremonini G, Sartori C, Bernasconi B, Ferrari B, Ghizzoni L. Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*. First published ahead of print January 29, 2008 10.1210/jc.2007-2063.
13. Landgren Stavreus-Evers B, Aghajanova L, Ruman A. Ghrelin and ghrelin receptor in luteal phase human endometrium. *ASRM Congress* 2007.
14. Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod* 2002; 67:1768-76.
15. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 2003; 144:1594-602.