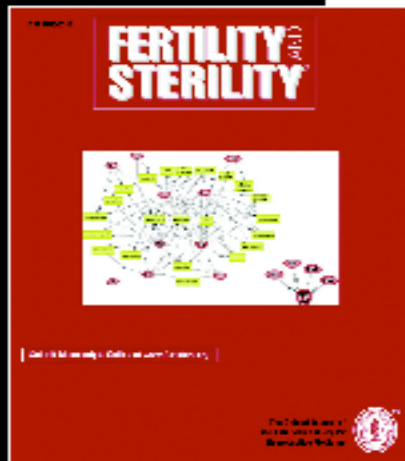


# Fertility & Sterility

**Artículos Seleccionados Traducidos**



# FERTILITY AND STERILITY

## Editor-in-Chief:

Alan H. DeCherney, M.D.  
Chief, Reproductive Biology and Medicine Branch,  
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

A Publication of the American  
Society for Reproductive Medicine

[www.fertstert.org](http://www.fertstert.org)

ISSN: 0015-0262

For more information about  
submission to *Fertility & Sterility*,  
please contact:

Eric Steinmetz, Managing Editor  
*Fertility and Sterility* Editorial Office  
American Society for Reproductive  
Medicine  
1209 Montgomery Highway  
Birmingham, AL 35216-2609  
Tel 205-978-5000  
Email [esteinmetz@asrm.org](mailto:esteinmetz@asrm.org)

Submit manuscripts online at  
<http://ees.elsevier.com/fbs>

For information about  
advertising in *Fertility & Sterility*,  
please contact:

Carol Clark  
Elsevier  
360 Park Avenue South  
New York, New York 10010  
Tel 212-633-3719  
Fax 212-633-3620  
Email [c.clark@elsevier.com](mailto:c.clark@elsevier.com)



*Fertility and Sterility* is a monthly international journal for obstetricians, gynecologists, reproductive endocrinologists, urologists, basic scientists and others who treat and investigate problems related to infertility and other human reproductive conditions.

The Journal publishes peer-reviewed original scientific articles in clinical and laboratory research relevant to reproductive endocrinology, urology, andrology, physiology, immunology, genetics, contraception, and menopause.

*Fertility and Sterility* encourages and supports meaningful basic and clinical research, and facilitates and promotes excellence in professional education, in the field of reproductive medicine.

Access to [www.fertstert.org](http://www.fertstert.org) is included with your paid subscription!

## For more information or to order, contact

**Phone:**  
1-800-654-2452 (U.S. and Canada)  
1-314-453-7041 (other countries)

**Visit:**  
[www.us.elsevierhealth.com](http://www.us.elsevierhealth.com)

## A new approach to ovarian reserve testing

### *Un nuevo enfoque para reserva ovárica*

Wenjie Sun, M.D.,<sup>a</sup> Barbara J. Stegmann, M.D., M.P.H.,<sup>b,c</sup> Melinda Henne, M.D., M.S.,<sup>c</sup>

William H. Catherino, M.D., Ph.D.,<sup>c,d</sup> and James H. Segars, M.D.<sup>b,c,d</sup>

<sup>a</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Wake Forest University Baptist Medical Center, Winston-Salem, North Carolina;

<sup>b</sup> Reproductive Biology and Medicine Branch, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda,

Maryland; <sup>c</sup>Walter Reed ART Program, Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC; and <sup>d</sup> Uniformed Services

University of Health Sciences, Dept. of Obstetrics and Gynecology, Bethesda, Maryland

### **Summary**

**Objective:** *To critically examine ovarian reserve testing before assisted reproduction.*

**Design:** *A PUBMED computer search to identify relevant literature.*

**Setting:** *Multiple sites.*

**Patient(s):** *Patients undergoing assisted reproduction.*

**Intervention(s):** *Testing for ovarian reserve.*

**Main Outcome Measure(s):** *Assisted reproductive technology (ART) and pregnancy outcomes.*

**Result(s):** *The prevalence of ovarian insufficiency varies significantly for women aged 30-45 years. Generalization or averaging of threshold values across different aged women leads to very poor sensitivity, specificity, and positive predictive value for all tests of ovarian reserve. Because of the changing prevalence of ovarian insufficiency, there is no single, suitable threshold value for any screening test of ovarian reserve. Our analysis supports dividing impaired ovarian reserve into two groups: age-dependent ovarian aging (physiologic) and premature (non-physiologic) reductions in the oocyte pool. Interpretation of any screening test used requires that age is considered as a variable. To guide clinical interpretation of test results, we suggest using a nomogram of FSH values versus expected delivery rate-per-cycle-start with ART for a given age.*

**Conclusion(s):** *Proper interpretation of screening tests for ovarian insufficiency in couples con-*

ring ART is important as the presence of impaired ovarian reserve is associated with a low likelihood of pregnancy. The condition of premature (nonphysiologic) ovarian insufficiency warrants additional research. (*Fertil Steril* 2008;90:2196-202. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine)

**Key words:** Ovarian reserve. Ovarian Insufficiency. FSH, CC challenge test. Inhibin. Diminished ovarian reserve. Assisted reproduction. In vitro fertilization (IVF). Assisted reproductive technologies (ART).

### **Resumen**

**Objetivo:** estudiar en forma crítica la reserva ovárica antes de realizar técnicas de reproducción asistida

**Diseño:** búsqueda informatizada de literatura relevante en PUBMED.

**Lugar:** múltiples sitios

**Paciente(s):** pacientes que realizan técnicas de reproducción asistida.

**Intervención:** Exámenes de reserva ovárica.

**Resultado principal:** embarazos logrados con técnica de reproducción asistida (TRA).

**Resultado(s):** la prevalencia de insuficiencia ovárica varía significativamente en mujeres de 30 a 45 años. La generalización de valores umbrales según distintas edades lleva a una pobre sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo para los exámenes de reserva ovárica. Debido a los cambios en la prevalencia de la insuficiencia ovárica no hay ningún valor umbral apropiado para los exámenes de reserva ovárica. Nuestro estudio divide ovarios con reserva disminuida en dos grupos: ovarios envejecidos por edad (fisiológico) y por reducción prematura del pool ovocitario (no fisiológico). La interpretación de cada examen de cribaje utilizado requiere que la edad sea considerada como variable. Para la interpretación clínica final de los resultados sugerimos utilizar un nomograma de valores de FSH versus las tasas de parto esperadas por ciclo iniciado con TRA para una edad determinada.

**Conclusión(es):** una correcta interpretación de los exámenes de cribaje para insuficiencia ovárica en parejas que consideran TRA es importante ya que la presencia de una reserva ovárica disminuida está asociado con una baja probabilidad de embarazo. La condición de insuficiencia ovárica prematura (no fisiológica) justifica mayores estudios. (*Fertil Steril* 2008;90:2196-202. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Palabras clave:** reserva ovárica, insuficiencia ovárica, FSH, Test de CC, inhibina, reserva ovárica disminuida, reproducción asistida, fertilización in vitro (FIV), técnicas de reproducción asistida (TRA).

Hace más de 100 años estudios de la población documentaron claramente una disminución de la fertilidad con la edad avanzada (1). Hoy en día en una cultura extensamente avanzada en el control de natalidad y la igualdad de mano de obra, las mujeres muchas veces posponen su embarazo para continuar con su carrera. Como resultado la edad de deseo de gestación se ha pospuesto de 20 a 30 años e inclusive a los 40 tempranos (2). Este cambio social determina un aumento en el número de mujeres que están interesadas en la infertilidad y tienen ciclos regulares, pero son subfértiles por una reducción en su reserva ovárica. El reconocimiento del profundo efecto adverso en la reducción del suministro ovocitario en la fertilidad hace llegar el concepto de reserva ovárica. El término

fue adoptado por Navot et al. en 1987 (3) para mujeres que tenían una "FSH exageada de 26 o más (>2 DS por encima del valor de control)" como resultado de un test de citrato de clomifeno.

Mujeres con reserva ovárica disminuida no tienen síntomas clínicos declarados más que subfertilidad y leves cambios en niveles de hormonas basales. Para ayudar a diagnosticar una reserva ovárica disminuida, Navot et al. (3), Scott et al. (4), Toner et al. (5), and Hofmann et al. (6) desarrollaron definiciones clínicas que asocian exámenes de reserva ovárica con pobre respuesta ovárica. Este reporte documentó altas tasas de cancelación y tasas de recién nacidos vivos reducidas con reproducción asistida (3-6) en mujeres con reserva ovárica disminuida. Estudios posteriores (7-

11) también reportaron una asociación clínica entre la reserva ovárica disminuida y tasas de aborto incrementadas. La condición de disminución de reserva ovárica no es solo un problema de pacientes que realizan técnicas de reproducción asistida (TRA), sino que también le concierne a los pacientes que realizan todo tipo de tratamientos de infertilidad (12)

Scott et al. (12) estimó que la prevalencia total de disminución de reserva ovárica es de 10% en la práctica general de infertilidad, con un incremento en mujeres mayores. Por ejemplo, de 236 parejas infértiles con un test de citrato de clomifeno anormal, 2 de 61 (3%) ocurrió en mujeres más jóvenes de 30 años, 5 de 72 (7%) fue en mujeres entre 30 y 34 años, 7 de 68 (10%) fue en mujeres entre 35 y 39 años, y 9 de 35 (26%) ocurrió en mujeres mayores de 40 años (12). Estos resultados fueron confirmados en un número considerable de estudios posteriores y existe una bien documentada relación entre FSH basal y la edad incrementada (5, 13, 14).

La fisiopatología de la reducción en la fertilidad asociada con la edad (1) es una reducción del pool de ovocitos acompañado con un incremento de la FSH dado por el feedback reducido de estrógenos e inhibina (15). También hay niveles hormonales bajos como el de la hormona antimülleriana (16). En teoría en algunas mujeres la reducción del número de ovocitos puede ser detectada por FSH de día 3 o por el nivel de la hormona antimülleriana, para otros sólo con test de provocación como el del CC. El término reserva ovárica disminuida intenta definir un valor umbral por encima del cual una reducción en el pool de ovocitos está asociado con fertilidad disminuida (4).

### **CRIBAJE DE INSUFICIENCIA OVARIA**

Muchos investigadores han utilizado un único examen para predecir respuesta ovárica a la estimulación y tasas de embarazo (TE) (4,5,15-19). Esos exámenes incluyen FSH basal en día 3 (4,16), test de CC (17, 20, 21), inhibina B (21-23), E2 (21, 24), conteo folicular (16, 27) y volumen ovárico (16,21). El éxito de cada examen puede ser medido en respuesta ovárica o en tasas de recién nacidos vivos por ciclo. Muchos estudios solo reportan respuesta ovárica pero no tasas de recién nacido vivo por ciclo. La respuesta ovárica es una medida indirecta del estatus del pool de folículos primordiales.

Aunque el logro de un embarazo puede estar influenciado por el número de ovocitos aspirados, el resultado de interés verdadero es la tasa de partos y por ello es el resultado a medir.

También es importante recalcar que ha habido una

variabilidad significativa en exámenes y estudios que han utilizado criterios o umbrales diferentes para definir respuesta ovárica pobre. Como resultado de esto se han reportado distinta sensibilidad y especificidad en los exámenes de cribaje. La tabla 1 (15, 16, 21, 22, 26-28) compara exámenes de cribaje comúnmente utilizados para evaluar respuesta ovárica a TRA con la sensibilidad y especificidad correspondiente. La tabla 1 también incluye los resultados de Esposito et al. (29) que correlaciona los valores de la FSH de día 3 con la tasa de recién nacido vivo por ciclo con su respectiva sensibilidad y especificidad asociado. Como sugirió Bancsi et al. (16) y Broekmans et al. (15), ningún examen posee una sensibilidad y especificidad satisfactoria para una aplicación clínica. Aún si se miden los recién nacidos (29), como el umbral considerado normal es incrementado, hay un aumento en la especificidad pero con la correspondiente reducción de la sensibilidad. Esto significa que muchas pacientes van a ser estimuladas sin éxito porque la sensibilidad del examen es extremadamente baja (cerca del 10%).

### **COMBINACIÓN DE EXAMENES DE CRIBAJE PARA INSUFICIENCIA OVÁRICA**

Debido a que exámenes aislados no identifican adecuadamente a mujeres con reserva ovárica disminuida, algunos investigadores han combinado exámenes con la intención de distinguir mujeres normales con aquellas con reserva ovárica disminuida (20). Hendriks et al. (20) ha reportado un aumento en la predicción de reserva ovárica disminuida a través de la medición del promedio en dos ciclos de FSH de día 3 seguida de inhibina B en día 10. Esta combinación demostró una sensibilidad de 71% y especificidad de 98%, un resultado de curva ROC de 0.92, la cual es mayor que la curva ROC para un solo examen (20). De forma similar, Bancsi et al. (16) utilizó una combinación de FSH de día 3, inhibina B, y recuento de folículos antrales para obtener una sensibilidad de 75%, una especificidad de 95%, y una curva ROC de 0.92. Los exámenes secuenciales y la combinación de exámenes superó la eficacia de un único test, pero los informes no tuvieron en cuenta la prevalencia en la insuficiencia ovárica en mujeres de distintas edades.

### **EL INTERROGANTE DE CUALQUIER EXAMEN DE CRIBAJE PARA INSUFICIENCIA OVÁRICA**

Aunque los exámenes secuenciales aumentan la posibilidad del diagnóstico de reserva ovárica dismi-

**Tabla 1**

*Rendimiento de examinar la insuficiencia ovárica en la predicción de respuesta ovárica pobre y recién nacidos vivos.*

	Datos continuos vs. Valores umbrales	Sensitividad	Especificidad	Ratio de probabilidad positivo	Abilidad predictiva (análisis ROC)	Nº de referencia
FSH <sup>a</sup>	Continuo	0,51-0,63	0,81	2,68	0,77	(15, 21, 22, 28)
	>10 mIU/mL	0,26-0,87	0,60-0,97	0,9-21,8	NA	
	>12 mIU/mL	0,24	1,00	0,24	NA	
CCCT <sup>b</sup>	Día 3/10 ≥ 10 mIU/mL	0,69	0,88	5,75	0,81	(15, 21)
	Día 10>10	0,65	0,87	5,0	NA	
	Día 10>15	0,35	0,96	8,1	NA	
Inhibina B	Continuo	0,52-0,69	0,63-0,80	1,93-3,45	0,71	(15, 21, 22, 28)
	40 pg/mL	0,87	0,49-0,64	1,7-2,42	NA	
	< 45 pg/mL	0,33-0,53	0,79-0,95	1,57-10,6	NA	
	53,8 pg/mL	0,39	0,94	6,5	NA	
AMH	Continuo	NR	NR	NR	0,92	(15, 21, 26, 28)
	<0,1 ng/mL	0,49-0,76	0,88-0,94	4,08-12,6	NA	
	<0,2 ng/mL	0,54-0,87	0,64-0,90	2,45-5,7	NA	
	0,25 ng/mL	0,91	0,91	10,1	NA	
	<0,3 ng/mL	0,60	0,89	5,6	NA	
Volumen ovárico	Continuo	0,81	0,81	4,26	0,82	(21)
	< 2,98 cm <sup>3</sup>	0,08-0,75	0,81-0,94	1,30-3,95	NA	
	< 7 cm <sup>3</sup>	0,39-0,55	0,67-0,85	1,67-2,51	NA	
	< 8,6 cm <sup>3</sup>	0,61	0,73	2,23	NA	
AFC	Continuo	0,75	0,63	2,03	0,78-0,80	(15, 21, 26-28)
	<4 antrales	0,09-0,86	0,84-0,97	3,3-5,4	NA	
	≤ 4 antrales	0,30-0,89	0,39-0,96	1,45	NA	
	< 6 antrales	0,36-0,81	0,77-0,89	1,57-7,4	NA	
FSH <sup>a</sup> recién nacido vivo	> 10 mIU /mL	0,19	0,91	0,8 <sup>c</sup>	0,28 <sup>c</sup>	(29)
	10-11,4 mIU/mL	0,09	0,91	0,71 <sup>c</sup>	0,28 <sup>c</sup>	
	> 11,4 mIU/mL	0,11	1,00	1,00 <sup>c</sup>	0,28 <sup>c</sup>	

Nota: AFC: conteo de folículos antrales; AMH: hormona antimülleriana; NA: no aplicable, capacidad predictiva mejor medida usando sensibilidad y especificidad; NR: no reportado; ROC: curva característica para el profesional operador.

<sup>a</sup> Nivel de FSH en día 3.

<sup>b</sup> Test de citrato de clomifeno, midiendo FSH en día 3 (basal) y en día 10.

<sup>c</sup> Calculados utilizando datos de prevalencia reportados por Esposito et al. (29).

nuida cuando se comparan con exámenes únicos, esta no es una solución satisfactoria por una simple razón: la prevalencia de la insuficiencia ovárica cambia con la edad y el rendimiento de cada examen cambia con la prevalencia. Este punto está ilustrado en la tabla 2. En este ejemplo, la prevalencia de reserva ovárica disminuida cambia de un 2% para mujeres de 30 años a virtualmente el 100% en mujeres de más de 45 años. Cuando la prevalencia de enfermedad es baja el valor predictivo positivo (VPP) del examen es bajo, a pesar de la sensibilidad y especificidad del examen. Teniendo un examen con un 95% de sensibilidad y especificidad y una prevalencia esperada de enfermedad del 2%, indica que este examen puede tener un PPV de sólo 27% (ej: hay un 27% de probabilidad de que la mujer realmente tenga una reserva ovárica disminuida si le da positivo el examen). Si la prevalencia aumenta a 10% (como para una mujer de 38 años), entonces la probabilidad de tener una reserva ovárica disminuida basada en este examen aumenta a 68%, pero este grado de certeza es ligeramente mayor que la posibilidad, o 50:50. En cambio, para las de 40 años una FSH elevada es más probable que refleje la presencia de enfermedad al aumentar el VPP a 89% cuando la prevalencia aumenta al 30%.

Al contrario de la intuición, cambiando la sensibilidad del examen no se corrige el problema. En el ejemplo anterior cuando la sensibilidad se incrementaba a 98%, la especificidad disminuía a 60%. Pero

más importantemente, el VPP en la de 30 años permanece baja (5%) porque la prevalencia de la enfermedad no ha cambiado (tabla 2). Es de recalcar que la sensibilidad publicada de los exámenes de reserva ovárica de cribaje (tabla 1) son menores que los valores utilizados en este ejemplo. En mujeres mayores, debido a la alta prevalencia de reserva ovárica disminuida los exámenes de cribaje pueden predecir con más precisión respuesta ovárica disminuida, incluso a niveles de sensibilidad y especificidad observados con exámenes utilizados a diario.

### UNA SOLUCION PARA EL PROBLEMA DE CRIBAJE DE OVARIOS INSUFICIENTES

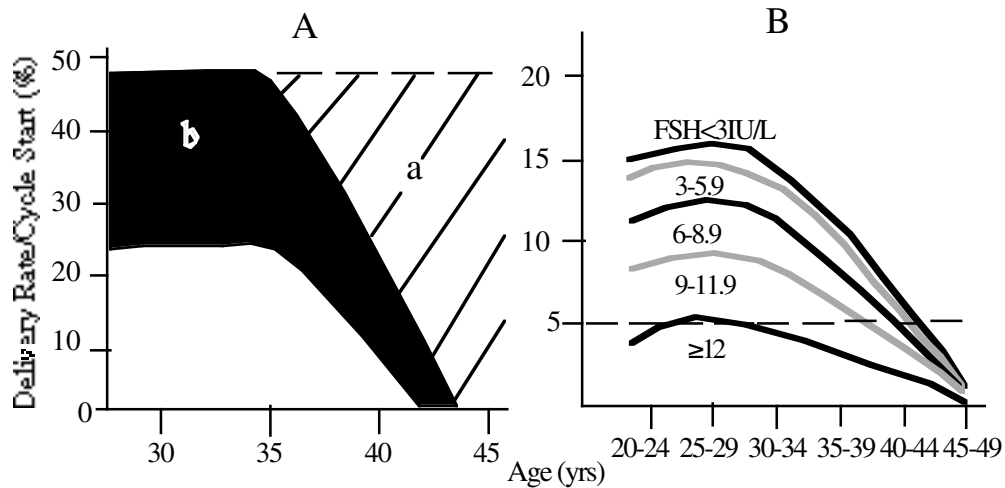
Para comprender completamente porque todos los exámenes tienen baja eficacia es necesario distinguir e envejecimiento ovárico fisiológico de insuficiencia ovárica prematura. Como se ilustra esquemáticamente en la figura 1<sup>a</sup>, un número de estudios han demostrado que el envejecimiento fisiológico lleva a un descenso en las tasas de partos por ciclo iniciado con TRA. Conceptualmente, la fertilidad óptima puede ser considerada como la fertilidad observada antes de los 30 años. Basados en este concepto, la reducción en la reserva de los ovarios dependiente de la edad puede ser entendida como la reducción de un nivel máximo (línea discontinua), como es mostrado en la

**Tabla 2**

*Cambios en la habilidad predictiva de los exámenes de cribaje basados en la prevalencia de enfermedad.*

	Edad (y)	probabilidad	odds pretest,	odds post-test	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo
Probabilidad de un test con 95% de sensibilidad y especificidad	30	0,02 (2/100)	0,02	0,39	0,27	0,99
	38	0,10 (10/100)	0,11	2,09	0,68	0,99
	40	0,30 (30/100)	0,43	8,14	0,89	0,98
Probabilidad de un test con un 98% de sensibilidad y un 60% de especificidad	30	0,02 (2/100)	0,02	0,05	0,05	0,99
	38	0,10 (10/100)	0,11	0,27	0,21	0,99
	40	0,30 (30/100)	0,43	1,05	0,51	0,99
Probabilidad de un test con un 71% de sensibilidad y un 98% de especificidad <sup>a</sup> .	30	0,02 (2/100)	0,02	0,72	0,42	0,99
	38	0,10 (10/100)	0,11	3,6	0,80	0,97
	40	0,30 (30/100)	0,43	15,2	0,94	0,89

<sup>a</sup> Mejor combinación de examen usando la mejor FSH de día 3 + la mejor inhibina B de día 10 durante 2 ciclos.



Sun. New approach to ovarian reserve testing. *Fertil Steril* 2008.

**Figura 1**

Efecto combinado de la edad y FSH en las tasas esperadas de partos con reproducción asistida. (A) tasas de partos por ciclo iniciado versus edad. El éxito máximo en técnicas de reproducción asistida (TRA) se presenta a los 30 años, denotado por la línea de puntos. La reducción fisiológica de las tasas de partos debido a la edad y la insuficiencia ovárica asociada está indicada por el área a rayas (a) en rojo; y se puede conceptualizar como una reducción por debajo de la línea de puntos. En cambio la insuficiencia ovárica no fisiológica asociada a FSH basal aumentada (u otros marcadores de insuficiencia ovárica) está también asociada con una reducción de la tasa de recién nacido vivo según el área (B) marcada con azul. (B) nomograma de tasa de partos por ciclo iniciado versus edad incluyendo FSH basal según Akande et al. (32)

La línea de puntos representa a un 5% de tasas esperadas de partos por ciclo iniciado. Notar que el 5% de tasas de partos cruza a valores de FSH de diferentes edades. Este nomograma (o un nomograma similar específico para programas de TRA) puede ser usado para determinar valores de FSH de pacientes y edad para asesorar la posibilidad de recién nacido vivo con reproducción asistida. El uso de nomograma da una valoración más cierta de resultados de TRA que edad o FSH basal como valores aislados.

zona a rayas (figura 1A, región a). Por el contrario la disminución no fisiológica de la reserva ovárica que no está explicada por la edad se puede entender como la reducción en la fertilidad en el área compartida (Fig. 1 A, región b).

Por qué dibujar esta distinción?

Fundamentalmente porque distinguiendo insuficiencia ovárica fisiológica debido a la edad de la insuficiencia ovárica no fisiológica, se identifica un grupo de mujeres por separado. Esta distinción es necesaria para identificar mujeres con disminución prematura de la función ovárica para una orientación adicional, quizás en lo que concierne a cambios de regímenes de estimulación. Por ejemplo, Abdalla y Thum (30) muestran que una FSH elevada estaba asociada con un incremento en la cantidad de gonadotropinas utilizadas, así como también en la alta tasa de cancelación en todos los grupos de edad, y recomienda cambiar los consejos que estas mujeres reciben para reflejar estos hechos.

También es necesario aclarar la relación de exámenes de cribaje de reserva ovárica para los resultados de TRA. El cambio de prevalencia de insuficiencia ovárica debido a la edad complica todos los exámenes de cribaje para reserva ovárica. Los cambios de prevalencia de la reserva ovárica disminuida causa considerable superposición en los resultados entre los dos grupos etáreos: aquellas fisiológicas con insuficiencia ovárica debido a la edad y las que poseen reserva ovárica disminuida no fisiológica. Esta superposición disminuye el rendimiento particularmente si, como ha sido sugerido, valores de FSH elevados en mujeres jóvenes puede ser más representativo de cantidad que de calidad ovocitaria (30).

Esta distinción naturalmente demuestra un segundo problema con respecto a las estrategias para la detección de reserva ovárica disminuida: el uso de un único valor umbral. Como ha sido mostrado no hay un único umbral o punto de corte para definir reserva ovárica disminuida, mas bien existe una suave conti-



nidad en la relación entre la reducción del pool ovocitario fisiológico y el no fisiológico, las cuales pueden o no superponerse. Al separar insuficiencia ovárica no fisiológica de fisiológica, puede ser posible definir las posibles contribuciones de cada mecanismo.

Los cambios de prevalencia de enfermedad significa para la mujer cercana a los 30 años que si su FSH de día 3 es normal, probablemente su reserva ovárica no esté disminuida. Si presenta un examen positivo (ej: FSH elevada en día 3) entonces puede existir un falso positivo y estarían indicado más estudios. En cambio si examinamos la FSH de día 3 de una mujer de 38 años es más predictivo de pobre respuesta. Sin embargo, si el test es negativo, la paciente puede seguir respondiendo pobremente, ya que el valor predictivo negativo (NPV) del examen es menos fidedigno que si la prevalencia de la enfermedad se incrementase. Esto es precisamente lo que se observa en la clínica: exámenes de cribaje de reserva ovárica son más predictivos en mujeres mayores.

Debido a que no está aceptado universalmente un umbral, las opiniones varían de cómo definir clínicamente una reducción significativa de la reserva ovárica. Algunas clínicas de TRA han elegido abandonar cualquier cribaje y proceder a estimular a todas las candidatas con una lógica tipo: "vamos viendo sobre la marcha"(16). Desde luego esta práctica lleva a altas tasas de cancelación o punción de ovocitos de pacientes en las cuales las tasas de recién nacidos vivos son de menos de 5%, con un gran costo para los pacientes (31). Por lo tanto se justifica un enfoque más costo-efectivo.

### **INTERPRETACIÓN DE LOS EXÁMENES DE CRIBAJE PARA INSUFICIENCIA OVÁRICA**

Mejor que un único umbral para mujeres de todas las edades sería para acercarnos más al problema, interpretar los exámenes de reserva ovárica basados en la edad individual de cada paciente.

Utilizando los resultados publicados por Akande (32), es posible definir una posibilidad aceptable de parto por ciclo iniciado, para instancias de 5% (Fig. 1B, línea discontinua), y luego interpretar que valores basales de FSH dan igual para el profesional y la paciente. Como se ilustra en la Figura 1B, el nivel de umbral cambia en función de la edad de la paciente. Utilizar un nomograma como este provee un asesoramiento real de la probabilidad de parto (justamente embarazo no). Basados en esta teoría, en la edad de 35 años o más joven, cualquier examen que sugiera in-

suficiencia ovárica necesitaría ser confirmado con un examen adicional (ej: conteo de folículos antrales)

Este examen adicional puede afirmar o refutar el diagnóstico de insuficiencia ovárica no fisiológica al aumentar las condiciones preexamen y según Hendriks et al. (33), puede aumentar el rendimiento del examen. Claramente el umbral para mujeres menores de 35 años será muy diferente del de mujeres mayores de 40 años, y estos umbrales deben ser basados en el nomograma. A la edad de 38 años, sin embargo, no se necesitarían otros exámenes complementarios ya que una FSH de día 3 elevada o un test de CC tiene un valor predictivo positivo elevado.

A pesar de que estos conceptos se deben probar a través de estudios clínicos prospectivos, este enfoque puede mejorar en el valor predictivo pobre de los exámenes de cribaje. Es de recalcar que el resultado de las tasas de partos de Akande et al. (32) son menores en comparación a los resultados en US, pero la relación de FSH y los resultados persisten incluso cuando las tasas de partos son mayores.

### **DEBERÍAN ABANDONARSE LOS EXÁMENES PARA INSUFICIENCIA OVÁRICA?**

A pesar de que las interpretaciones de los exámenes de cribaje para reserva ovárica disminuida son confusos, el cribaje apropiado y diagnóstico es importante. Hay consecuencias significantes asociadas al diagnóstico, como la reducción de las tasas de parto, aumento de tasas de abortos (6-11,34), y coste elevado por parto (31, 35-37).

El aumento de coste por reserva ovárica disminuida fue ilustrado en un estudio de 1,238 primeros ciclos en el Centro Walter Reed Army Medical del 1 de enero de 1999 al 31 de diciembre de 2003 (31). En otro estudio (37), los cálculos fueron basados en ciclos iniciados para calcular las tasas de ciclos cancelados en cada grupo etario y para dar una estimación más certera del impacto de la insuficiencia ovárica y las tasas de abortos espontáneos de nacidos vivos. Utilizando un costo estimado por ciclo en 2002 de \$9,226, Collins estimó que el coste de un recién nacido vivo por TRA en una mujer de 35 años con un nivel de FSH <10 IU/L fue de 28,698 y se incrementaba a 36,579 cuando la FSH era >10IU/L (37). A la edad de 42 años, el coste por parto con un nivel de FSH <10 IU/L era de \$122,178, comparado con \$309,925 cuando la FSH basal era de 10 o mayor (37). Claramente el costo de las TRA justifica el desarrollo de mejores exámenes de cribaje y diagnóstico.

## OTROS BENEFICIOS POTENCIALES EN DISTINGUIR INSUFICIENCIA OVÁRICA RELACIONADA A LA EDAD DE LA INSUFICIENCIA OVÁRICA NO FISIOLÓGICA

Mujeres con reserva ovárica disminuida no solo tienen menores posibilidades de embarazo, sino que también tienen un aumento significativo de tasas de abortos (6-11, 34). Algunos investigadores creen que se debe a pobre calidad ovocitaria o aumento de las tasas de aneuploidías fetales (39-44), sin embargo Abdala y Thumm (30) no pudieron confirmar esta asociación en su estudio.

El incremento observado de aneuploidías nos lleva a un interrogante: deberían las mujeres con insuficiencia ovárica no fisiológica tener criterios de exámenes de cribaje diferente para anomalías fetales con respecto a la población general?. La amniocentesis es actualmente recomendada para mujeres con edad materna avanzada, o en presencia de hallazgos anormales en la ecografía o un triple cribaje anormal, pero no para mujeres con insuficiencia ovárica no fisiológica. Como la incidencia de aneuploidías está aumentada en mujeres con insuficiencia ovárica asociada a la edad (8), estas mujeres podrían beneficiarse del cribaje, un punto que requiere estudios prospectivos adicionales.

### CONCLUSIONES

La insuficiencia ovárica es un proceso insidioso que comienza años antes del cese de la menstruación. A pesar de que es una consecuencia fisiológica de la edad, un número de mujeres están también afectadas por la reducción no fisiológica del pool ovocitario, independiente de la edad. Debido al efecto marcado de la edad nosotros sugerimos el uso de nomogramas más que un simple umbral o un punto de corte específico para diagnosticar reserva ovárica disminuida.

Una valoración exacta de la insuficiencia ovárica permite al profesional confeccionar un tratamiento según las necesidades individuales de cada mujer.

### BIBLIOGRAFÍA

1. **Duncan M.:** Fecundity, fertility, sterility and allied topics. New York: Gryphon Editions, 1895.
2. **Diczfalusy E.:** Contraception and society. Eur J Contracept Reprod Health Care 2002; 7: 199-209.
3. **Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ.:** Prognosis assessment of female fecundity. Lancet 1987; 2: 645-7.
4. **Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S,**

- Robinson S, Rosenwaks Z.:** Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 1989; 51: 651-4.
5. **Toner JP, Philput CB, Jones GS, Muasher SJ.:** Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. Fertil Steril 1991; 55: 784-91.
6. **Hofmann GE, Danforth DR, Seifer DB.:** Inhibin-B: the physiologic basis of the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. Fertil Steril 1998; 69: 474-7.
7. **Trout SW, Seifer DB.:** Do women with unexplained recurrent pregnancy loss have higher day 3 serum FSH and estradiol values? Fertil Steril 2000; 74: 335-7.
8. **Levi AJ, Raynault MF; Bergh PA, Drews MR, Miller BT, Scott RT Jr.:** Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve. Fertil Steril 2001; 76: 666-9.
9. **Kuo PL, Guo HR.:** Mechanism of recurrent spontaneous abortions in women with mosaicism of X-chromosome aneuploidies. Fertil Steril 2004; 82: 1594-601.
10. **Meden-Vrtovec H.:** Ovarian aging and infertility. Clin Exp Obstet Gynecol 2004; 31: 5-8.
11. **Elter K, Kavak ZN, Gokaslan H, Pekin T.:** Antral follicle assessment after down-regulation may be a useful tool for predicting pregnancy loss in in vitro fertilization pregnancies. Gynecol Endocrinol 2005; 21: 33-7.
12. **Scott RT, Leonardi MR, Hofmann GE, Illions EH, Neal GS, Navot D.:** A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge test screening of the general infertility population. Obstet Gynecol 1993; 82: 539-44.
13. **Buin JD, te Velde ER.:** Female reproductive ageing: concepts and consequences. In: Tulandi T, Gosden R, eds. Preservation of fertility. London, UK: Taylor & Francis, 2004: 3.
14. **Te Velde ER, Pearson P.:** The variability of female reproductive ageing. Human Reproduction Update 2002; 8: 141-54.
15. **Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB.:** A systematic review of test predicting ovarian reserve and IVF outcome. Hum Reprod Update 2006; 12: 685-718.
16. **Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER.:** Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. Fertil Steril 2002; 77: 328-36.
17. **Csemiczky G, Harlin J, Fried G.:** Predictive power of clomiphene citrate challenge test for failure of in vitro fertilization treatment. Acta Obstet Gynecol Scand 2002; 81: 954-61.
18. **Sharif K, Elgendy M, Lashen H, Afnan M.:** Age and basal follicle stimulating hormone as predictors of in vitro fertilisation outcome. Br J Obstet Gynaecol 1998; 105: 107-12.

19. **Bancsi LF, Broekmans FJ, Mol BW, Habbema JD, te Velde ER.:** Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2003; 79: 1091-100.
20. **Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, de Jong FH, Looman CW, te Velde ER.:** Repeated domiphene citrate challenge testing in the prediction of outcome in IVF: a comparison with basal markers for ovarian reserve. *Hum Reprod* 2005; 20: 163-9.
21. **Erdem M, Erdem A, Gursoy R, Biberoglu K.:** Comparison of basal and clomiphene citrate induced FSH and inhibin B, ovarian volume and antral follicle counts as ovarian reserve tests and predictors of poor ovarian response in IVF. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 37-45.
22. **Balash J, Creus M, Fabregues F, Carmona F, Casamitjana R, Ascaso C, et al.:** Inhibin, follicle-stimulating hormone, and age as predictors of ovarian response in in vitro fertilization cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1226-30.
23. **Seuffer DB, Scott RT Jr, Bergh PA, Abrogast LK, Friedman CI, Mack CK, et al.:** Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 1999; 72: 63-5.
24. **Frattarelli JL, Bergh PA, Drews MR, Shahara FI, Scott RT.:** Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2000; 74: 518-24.
25. **van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al.:** Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002; 17: 3065-71.
26. **Ficicoglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z.:** Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006; 85: 592-6.
27. **Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT, Segars JH.:** A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2003; 80: 350-5.
28. **Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P.:** Antral follicle count, antimüllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG* 2005; 112: 1384-90.
29. **Esposito MA, Coutifaris C, Bamhart KT.:** A moderately elevated day 3 FSH concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Hum Reprod* 2002; 17: 118-23.
30. **Abdalla H, Thum MY.:** An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod* 2004; 19: 893-8.
31. **Henne MB, Stegmann BJ, Neithardt AB, Catherino WH, Armstrong AY, Kao TC, Segars JH.:** The combined effect of age and basal FSH on the cost of a live birth at ART. *Fertil Steril* 2008; 89: 104-10.
32. **Akande VA, Fleming CF, Hunt LP, Keay SD, Jenkins JM.:** Biological versus chronological ageing of oocytes, distinguishable by raised FSH levels in relation to the success of IVF treatment. *Hum Reprod* 2002; 17: 2003-8.
33. **Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, te Velde ER, Broekmans FJ.:** Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 2005; 83: 291-301.
34. **Gurbuz B, Yalti S, Ficicoglu C, Ozden S, Yildirim G, Sayar C.:** Basal hormone levels in women with recurrent pregnancy loss. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17: 317-21.
35. **Van Vpprjos BJ, Syrop CH.:** Cost-effective treatment for the couple with infertility. *Clin Obstet Gynecol* 2000; 43: 958-73.
36. **Jain T, Missmer SA, Hornstein MD.:** Trends in embryo-transfer practice and in outcomes of the use of assisted reproductive technology in the United States. *N Engl J Med* 2004; 350: 1639-45.
37. **Stegmann BJ, Henne MB, Neithardt AB, Catherino WH, Kao TC, Segars JH.:** Cost analysis of a successful ART cycle women with an elevated day 3 FSH. In: Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. New Orleans LA, Oct 23-25, 2006.
38. **Collins J.:** Cost-effectiveness of in vitro fertilization. *Semin Reprod Med* 2001; 19: 279-89.
39. **Munne S, Cohen J, Sable D.:** Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril* 2002; 78: 234-6.
40. **Warburton D.:** Biological aging and the etiology of aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 266-72.
41. **van Montfrans JM, Dorland M, Oosterhuis GJ, van Vugt JM, Rekers-Mombarg LT, Lambalk CB.:** Increased concentrations of follicle-stimulating hormone in mothers of children with Down's syndrome. *Lancet* 1999; 353: 1853-4.
42. **Freeman SB, Yang Q, Allran K, Taft LF, Sherman SL.:** Women with a reduced ovarian complement may have an increased risk for a child with Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1680-3.
43. **van Montfrans JM, van Hooff MH, Martens F, Lambalk CB.:** Basal FSH, estradiol and inhibin B concentrations in women with a previous Down's syndrome affected pregnancy. *Hum Reprod* 2002; 17: 44-7.
44. **Nasseri A, Mukherjee T, Grifo JA, Noyes N, Krey L, Copperman AB.:** Elevated day 3 serum follicle stimulating hormone and/or estradiol may predict fetal aneuploidy. *Fertil Steril* 1999; 71: 715-8.

## Derivation of developmentally competent oocytes by the culture of preantral follicles retrieved from adult ovaries: maturation, blastocyst formation, and embryonic stem cell transformation

*Obtención de ovocitos con capacidad de desarrollo mediante cultivo de folículos preantrales extraídos de ovarios adultos: maduración, formación de blastocistos y transformación de células madres embrionarias.*

In Wook Kim, M.S.,<sup>a</sup> Seung Pyo Gong, B.Sc.,<sup>a</sup> Cho Rong Yoo, B.Sc.,<sup>a</sup> Jun Hee Choi, B.Sc.,<sup>a</sup>

Dae Yong Kim, Ph.D., D.V.M.,<sup>b</sup> and Jeong Mook Lim, Ph.D., D.V.M.<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Gamete and Stem Cell Biotechnology Laboratory, Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul, Korea; <sup>b</sup> College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea; and <sup>c</sup> Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea

### Summary

**Objective:** *To determine whether the preantral follicles in adult ovaries can generate developmentally competent oocytes after in vitro culture.*

**Design:** *Prospective, animal-model study.*

**Setting:** *Gamete and Stem Cell Biotechnology Laboratory, Seoul National University, Seoul, Korea.*

**Animal(s)** *B6CBAF1 mice.*

**Intervention(s):** *Preantral follicles collected from 8-week-old mice were cultured in vitro.*

**Main Outcome Measure(s):** *Follicle development, embryogenesis, and embryonic stem cell characterization.*

**Result(s):** *A mean of 50.3 preantral follicles were retrieved from one adult animal, which is significantly less than the number (88.7 follicles) retrieved from a prepubertal female. Extension of the culture period greatly improved oocyte maturation; increased follicular growth through the pseudo-antral (89%-91% vs. 32%) or mature oocyte stage (65%-77% vs. 13%) was observed after 12 or 13 days of culture compared with 9 days of culture. Blastocyst formation after parthenogenesis was detected in only one case, in comparison, the use of IVF yielded a large number of embryos that developed into blastocysts. A mean of 14.7 intrafollicular oocytes per animal were produced after 13 days of culture,*

and 41% of those developed into blastocysts after IVF. Embryonic stem cell-like colonies were established by subculturing the inner cell mass cells from the blastocysts.

Conclusion(s): *Developmentally competent oocytes can be generated by culturing adult preantral follicles. These results may help increase the feasibility of follicle culture systems. (Fertil Steril® 2008; --:---. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine)*

**Key words:** Preantral follicle. Adult. Culture duration. Oocyte development. Blastocyst. Embryonic stem cell.

### **Resumen**

Objetivo: *determinar si los folículos preantrales de ovarios adultos pueden generar ovocitos con capacidad de desarrollo tras su cultivo in vitro.*

Diseño: *estudio prospectivo de modelo animal.*

Lugar: *laboratorio de gametos y células madres, Universidad Nacional de Seúl, Seúl, Corea.*

Intervención(es): *obtención de folículos preantrales de ratones de 8 semanas de vida para cultivo in vitro.*

Principal resultado(s) medido(s): *desarrollo folicular, embriogénesis y caracterización de células madres embrionarias.*

Resultado(s): *una media de 50.3 folículos preantrales fueron extraídos de un animal adulto, lo que significa un número menor (88.7 folículos) que los extraídos de una hembra pre púber. La extensión del período de cultivo aumentó la maduración ovocitaria; después de 12 o 13 días de cultivo comparado con 9 días de cultivo, aumentó el crecimiento folicular a pseudo-antral (89-91% vs 32%) y el estadio de maduración ovocitaria (65-77% vs 13%). La formación de Blastocistos después de partenogénesis fue detectada solamente en un caso; en comparación, el uso de FIV produjo un gran número de embriones que se desarrollaron a blastocistos. Se produjo una media de 14.7 ovocitos intrafoliculares por animal después de 13 días de cultivo, y 41% de estos se desarrollaron a blastocistos después de FIV. Colonias de células madres embrionarias fueron reconocidas al subcultivar las células de la masa celular de los blastocistos.*

Conclusion(es): *se pueden generar ovocitos con capacidad de desarrollo cultivando folículos preantrales de adultos. Estos resultados pueden ayudar a aumentar la viabilidad de sistemas de cultivo celular. (Fertil Steril\_ 2008;--:---. \_2008 by American Society for Reproductive Medicine.)*

**Palabras clave:** folículo preantral, adulto, duración de cultivo, desarrollo ovocitario, blastocisto, célula madre embrionaria.

Intentamos identificar una nueva fuente de ovocitos con capacidad de desarrollo para facilitar el avance de tecnologías novedosas en reproducción asistida y terapias con de reemplazo celular. Avances recientes en cultivo de folículos preantrales (1-6) y en células madres embrionarias (Embryonic Stem Cell=ESC) creados por el cultivo de folículos preantrales y la partenogénesis ovocitaria (7, 8) han confirmado la viabilidad de la tecnología para cultivo folicular. Para una recolección más óptima de folículos muchos estudios utilizan ratones prepuberales (2 semanas de vida) porque el número de folículos de reserva en los ovarios llegan al máximo antes de nacer y luego descienden gradualmente después del nacimiento (1-4,

6-8). Así mismo muchos folículos preantrales desaparecen o se vuelven inactivos en ovarios adultos (9-11). La eficacia de utilizar folículos de ovarios adultos, lo que ha sido publicado solo una vez en humanos (5), se dificulta por la capacidad de crecimiento limitado de las células in vitro. De esta manera los ovarios adultos no son considerados adecuados para la obtención de un número grande de folículos preantrales.

Para incrementar la disponibilidad de sistemas de cultivo folicular intentamos utilizar ovarios adultos para la recolección de folículos. El uso de ovarios adultos o añosos para la obtención de folículos y desarrollo in vitro rápidamente aumentó la viabilidad

clínica de un sistema de cultivo folicular, pero el método debe ser probado para uso clínico. Hemos llevado a cabo una serie de experimentos para evaluar la utilidad de la obtención de folículos preantrales de ovarios adultos para generar ovocitos con capacidad de desarrollo. Se realizó un estudio prospectivo con asignación randomizada, y se utilizaron diversos parámetros de desarrollo de gametos y desarrollo de embriones y creación de células madres.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales experimentales

Los folículos preantrales fueron extraídos de ratones híbridos F1 B6CBAF1 (C57BL6 X CBA/ca) de 8 (adulto) y 2 (pre púber, control) semanas de edad (7,12). Todos los procedimientos de manejo animal, cría y cirugía fueron dirigidos en concordancia con los estandartes de la Universidad Nacional de Seúl, Corea. El comité de cuidado animal y uso institucional en la Universidad Nacional de Seúl aprobó nuestra propuesta de investigación en abril de 2005 (#SNU0050331-02).

### AISLAMIENTO DE FOLÍCULOS PREANTRALES

Los ovarios extraídos de las hembras sacrificadas fueron depositados en medio L-15 Leibovitz-glutamax (GIBCO Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino inactivado con calor (HyClone Laboratories, Logan, UT). Se utilizaron métodos enzimáticos y no enzimáticos (mecánicos) (12, 13) para la obtención de folículos en un estudio preliminar (datos no mostrados); sin embargo, ninguno de los métodos mostraba efecto significativo en la misma categoría de folículos. Por otro lado, el número de folículos primordiales secundarios tempranos extraídos fue mayor que el número de folículos primarios o secundarios tardíos. Por lo tanto utilizamos aislamiento mecánico para obtener folículos secundarios tempranos para nuestro experimento. Los folículos preantrales fueron extraídos de los ratones adultos con una aguja de calibre 30. Los folículos secundarios tempranos (100-125  $\mu$ m de diámetro) con múltiples capas de células de la granulosa y un ovocito en su interior, fueron depositados individualmente en gotas de cultivo de 10  $\mu$ l cubiertas de aceite mineral y dispuestas en placas Petri para cultivo in Vitro.

## CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS PREANTRALES

Los folículos secundarios fueron cultivados individualmente como se describió previamente (8). Los folículos se cultivaron en medio  $\alpha$ MEM-glutamato con ribonucleosido y deoxiribonucleosido (GIBCO Invitrogen) suplementado con 5% de suero de bovino fetal (vol/vol); medio líquido con insulina, transferrina, y selenio (1%, vol/vol); FSH humana recombinante (100 mLU/mL; Organon, OSS, Holanda); y 1% (vol/vol) de solución de penicilina liofilizada-streptomina (GIBCO Invitrogen) a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Como resultado de la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (7), se formó una estructura transparente tipo antro (pseudo-antro) en algunos de los folículos preantrales.

## INDUCCIÓN DE LA MADURACIÓN Y COLECCIÓN DE LOS PRESUNTOS OVOCITOS MADUROS

Para inducir la maduración de los ovocitos intrafolliculares durante el cultivo folicular, se añadió al medio 2,5 IU/mL hCG (Pregnyl; Organon) y 5 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) 16 horas antes del fin de la segunda fase de cultivo. Aquellos ovocitos que se separaron espontáneamente de los folículos pseudo-antrales, después de la expansión celular del cúmulus, se definieron como ovocitos "Mucified" en proceso de maduración. Un experimento suplementario mostró que la mayoría de los ovocitos mucified se desarrollaron al menos hasta el estadio de desaparición de la vesícula germinal (128 de 146 [88%]). Los ovocitos obtenidos del cultivo folicular fueron liberados de las células del cúmulus pipeteando y subsecuentemente colocados en medio M2 suplementado con 4 mg/mL de suero bovino albúmina y 200 IU/mL de hialuronidasa. La maduración meiótica de los ovocitos fue valorada mediante la expansión de las células del cúmulus y la presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino, que se pudo observar tras eliminar las células expandidas del cúmulus.

## ACTIVACIÓN PARTENOGENÉTICA Y FIV DE LOS OVOCITOS

La activación partenogénica de los ovocitos maduros en los folículos se logró cultivando los ovocitos

en medio optimizado de potasio y libre de calcio. Para inducir la progresión de la maduración meiótica del estadio de metafase II y retener el corpúsculo polar en el citoplasma por la diploidización de los ovocitos activados, los ovocitos fueron cultivados en KSOM suplementado con 10 mM SrCl<sub>2</sub> y 5 µg/mL citocalasina B por 4 horas. Los ovocitos activados fueron subsecuentemente cultivados en una gota de 5 µL de medio modificado de Chatot, Ziomek y Bavister (CZB) que contiene 81.6 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.7 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 31.3 mM lactato sódico, 0.3 mM piruvato sódico, 1 mM glutamina, 0.1 mM ácido etilendiamintetraacético, antibióticos y 5 mg/mL de albumina de suero bovino. Los ovocitos fueron cultivados a 37°C bajo 5% CO<sub>2</sub> en aire. La división celular y el desarrollo a blastocistos fue observado en un microscopio invertido (Eclipse TE-3000; Nikon, Tokio, Japon) 28 y 124 horas, después de la activación, respectivamente.

Los ovocitos maduros, rodeados por cúmulus en los folículos, fueron fertilizados con semen epididimal en KSOM por 4-6 horas. Los ovocitos fertilizados fueron cultivados en una gota de 5 µL de medio CZB modificado por otras 120 horas a 37°C bajo 5% CO<sub>2</sub> en aire.

### **APARICIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ESCS (células madres embrionarias)**

Los blastocistos obtenidos por cada tratamiento fueron subcultivados en una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón para originar ESCs de las células de la masa celular interna (ICM) (6). Para determinar si la formación de colonias celulares tenían actividad de células madres se utilizó un programa de caracterización estándar que incluyó la detección de marcadores de reactividad de células madres (estado específico de antígeno embrionario[SSEA]-1, -3, y -4 e integrinas α6 y β1), la monitorización de expresión génica relacionada con células madres (Oct-4, Nanog, Rex1, Cripto, Dnmt3b, Lftrc, Stat3, Bmp4, Fgf4, Foxd3, Sox2, CD9, and Gdf3), la detección de expresión génica relacionada al sexo (Zfy 1 específico del cromosoma Y y Xist específico del cromosoma X), formación de cuerpo embrioides de la colonia celular libre del medio con factor inhibidor de leucemia (LIF), y la formación de teratomas después de la transferencia de células formadoras de colonias (ICM) en ratones inmunodeficientes.

### **DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

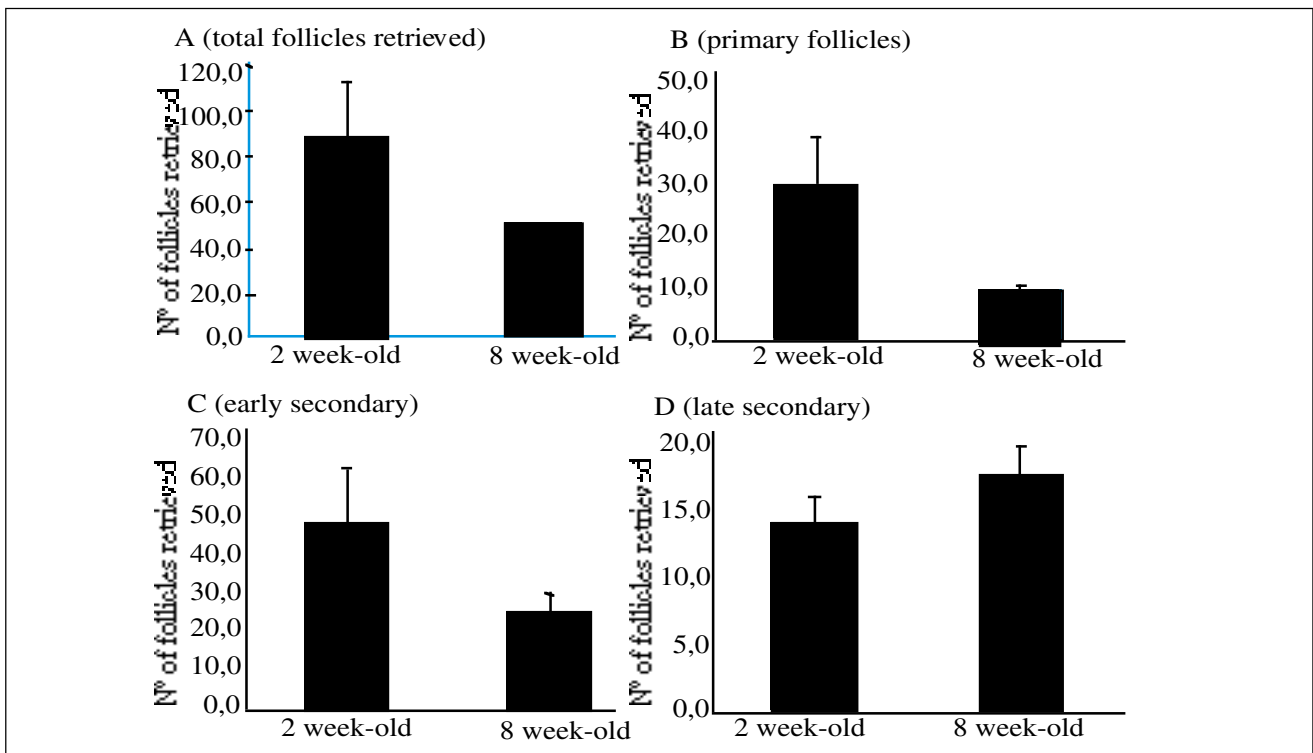
En la primer serie de experimentos evaluamos la posibilidad de utilizar folículos preantrales extraídos de ovarios adultos para cultivo in vitro. Comparamos los números de folículos primarios, secundarios tempranos y tardíos extraídos de ovarios adultos con aquellos extraídos de ovarios pre puberales (Fig. 1). Concomitantemente se realizó una comparación entre ratones maduros y pre púber de los métodos de extracción (experimento adicional, datos no mostrados) y la expresión de genes relacionados a foliculogénesis (GDF9, KGF, TGFβ1, AMH, BMP7, and c-kit) en los folículos. En nuestra segunda serie de experimentos, modificamos nuestro sistema de cultivo para producir ovocitos con capacidad de desarrollo de folículos preantrales adultos. El período de cultivo fue extendido de 9 a 13 días (Tabla 1), y se examinó el efecto de cambios en la cantidad de FSH en el medio (200 vs 400 mIU/mL) (experimento adicional, datos no mostrados). En nuestra tercer serie de experimentos, evaluamos si los ovocitos maduros en el cultivo in vitro de folículos preantrales pueden desarrollarse a blastocistos después de FIV o de activación partenogénica (Fig. 2). Luego examinamos si las células ICM de los blastocistos pueden derivar en ESCs monitorizando la actividad de las células madres de las células formadoras de colonias (Figs. 3 y 4).

Los datos obtenidos de por lo menos tres repeticiones fue sujeto a análisis estadístico y a un modelo lineal generalizado (PROC-GLM) usando el software Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC). Cuando se detectó un efecto significativo modelo, cada efecto tratado fue comparado usando el método least-squares. El nivel de significancia fue definido como P <.05.

### **RESULTADOS**

#### **EXPERIMENTO 1: Extracción de folículos preantrales de ovarios adultos**

Como se muestra en la Figura 1, el número total de folículos preantrales extraídos de los ovarios adultos por métodos mecánicos fue menor que los extraídos de los ovarios prepuberales (50.3 vs 88.7 folículos; P=.0567). En el caso de etapas primarias y secundarias tempranas, el número de folículos extraídos del grupo pre púber fue mayor que el extraído del grupo de adultos. Sin embargo la mayoría de los folículos que se desarrollaron a la etapa secundaria tar-



**Figura 1**

Comparación del número de folículos preantrales extraídos de ratones B6CBAF1 de 2 semanas de edad (pre púber) y 8 semanas (adultos). Los folículos preantrales de las etapas primera, segunda temprana y segunda tardía fueron mecánicamente recogidos de ovarios donados. Sobre todo se extrajeron mayor número en el grupo pre púber que en el de adultos (A). En el caso de etapas primarias (B) y secundarias tempranas (C), la cantidad de folículos fue mayor en el grupo pre púber que en el de los adultos, sin embargo se extrajeron más folículos secundarios tardíos (D) de adultos que de los ratones pre púberes. El efecto modelo de los tratamientos (indicado por el valor P) fueron .0567, .0211, .0623, y .0927 para el número total de folículos preantrales extraídos y el número de folículos primarios, secundarios tempranos, y secundarios tardíos extraídos respectivamente.

día, fueron extraídos de los ovarios adultos más que de los ovarios pre puberales. En un experimento suplementario (datos no mostrados), se detectó una diferencia significativa en el crecimiento folicular entre los folículos de diferentes etapas. A pesar de que la mayoría de los folículos que crecían en la etapa secundaria tardía desarrollaban ovocitos “Mucified”, el número más importante de ovocitos por animal muerto fue mayor después del cultivo de folículos secundarios tempranos que del cultivo de folículos primarios o secundarios tardíos. No se detectó ningún descenso significativo en la expresión de varios genes relacionados con foliculogénesis en los folículos secundarios extraídos de ovarios adultos, comparado con aquellos folículos secundarios extraídos de ovarios pre puberales (experimento adicional, datos no mostrados).

## EXPERIMENTO 2: Desarrollo competente del crecimiento de ovocitos intrafolliculares de folículos preantrales cultivados in vitro.

Las hormonas estimuladoras de folículos no alteran significativamente la tasa de crecimiento folicular o de maduración ovocitaria en nuestro experimento adicional (datos no mostrados); sin embargo se detectó un efecto significativo ( $P < .0001$ ) en el crecimiento folicular y en el desarrollo ovocitario después de un incremento en la duración del período de cultivo de los folículos secundarios tempranos (Tabla 1). Se observó un mayor número de folículos desarrollándose a estadio pseudo-antral (89%-91% vs. 32%-66%) y comenzando maduración ovocitaria (95%-98% vs. 80%-89%) después de 12 o 13 días de cultivo en comparación a 9, 10, u 11 días de cultivo. La tasa de maduración fue mayor en los cultivos de 13 días que en los otros (77% vs. 13-



**Tabla 1**

*Efecto de la extensión del cultivo de folículos preantrales secundarios tempranos a los 13 días en la capacidad de desarrollo de los ovocitos intrafolliculares*

Duración de cultivo (d)	Animales sacrificados	Folículos cultivados	Folículos Pseudo-antrales <sup>a</sup>	Ovocitos MUCIFIED <sup>a</sup>	Ovocitos partenogénicos			Nº de ovocitos maduros por animal (media±SD)
					maduros <sup>a</sup>	divididos <sup>b</sup>	desarrollados a blastocistos <sup>b</sup>	
9	3	60	19 (32) <sup>c</sup>	48 (80) <sup>c</sup>	8 (13) <sup>c</sup>	2 (25)	0	2,7±1,7 <sup>c</sup>
10	3	60	28 (47) <sup>d</sup>	48 (80) <sup>c</sup>	10 (17) <sup>c</sup>	4 (40)	0	3,3±1,5 <sup>c</sup>
11	3	61	40 (66) <sup>e</sup>	54 (89) <sup>c,d</sup>	26 (43) <sup>d</sup>	8 (31)	1 (4)	8,7±4,0 <sup>d</sup>
12	3	57	52 (91) <sup>f</sup>	56 (98) <sup>d</sup>	37 (65) <sup>e</sup>	6 (16)	0	12,3±2,5 <sup>e</sup>
13	3	57	51 (89) <sup>f</sup>	54 (95) <sup>d</sup>	44 (77) <sup>e</sup>	9 (20)	0	14,7±4,2 <sup>e</sup>

NOTA: los valores son números (porcentajes), a menos que se especifique lo contrario. Cien mUI de FSH fueron añadidas al medio de cultivo folicular. Los efectos modelos del tratamiento que fueron indicados como valor P fueron de < .0001, < .0001, < .0001, < .4674, < .4375, y < .0001 en el número de folículos pseudoantrales, en el número de folículos difusos, en el número de ovocitos madurados partenogénicamente, en los divididos y desarrollados a blastocistos, y en el número de ovocitos madurados/animal, respectivamente.

<sup>a</sup> Porcentaje referido al número de folículos cultivados

<sup>b</sup> Porcentaje referido al número de ovocitos madurados partenogénicamente.

<sup>c,d,e,f</sup> Diferentes superíndices que dentro del subtotal son significativamente diferentes (P< .05).

Kim. Culture of adult preantral follicle. Fertil Steril 2008

65%). Cuando el número de ovocitos maduros por animal sacrificado fue analizado, se detectó un aumento gradual pero significativo al extender el período de cultivo (2.7-14.7 folículos; P<.0001).

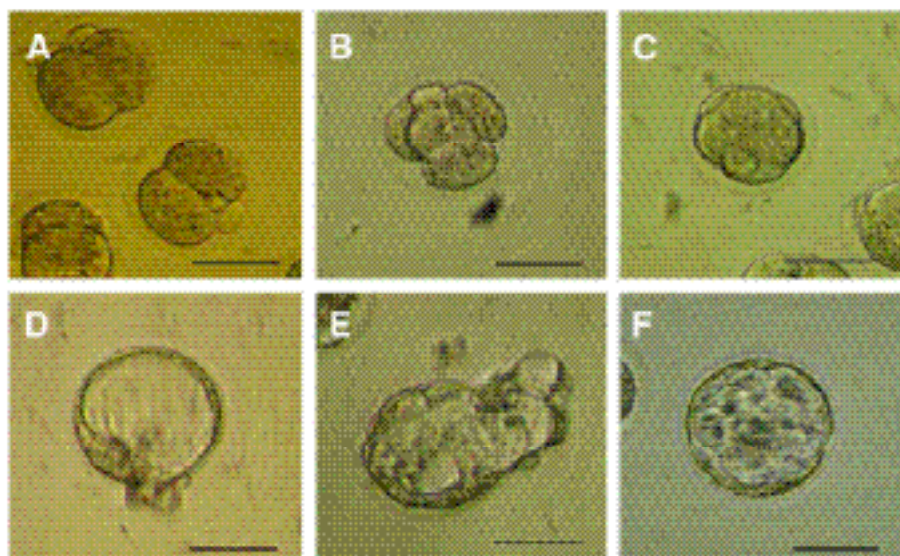
### EXPERIMENTO 3: Generación de embriones viables y creación de ESCs.

Como muestra la Tabla 2, se detectó niveles más altos (P<.0001) de división (89%-19%) y formación de blastocistos (41% vs 0%) después de FIV en comparación con activación partenogénica. No se detectó morfología aberrante en el desarrollo de embriones después de fertilización (Figura 2). Los blastocistos obtenidos por FIV fueron subcultivados en una monocapa de fibroblasto embrionario de ratón para obtener ESCs, y uno de los cultivos formó células formadoras de colonias. Las células formadoras de colonias fueron positivas para fosfatasa alcalina, y anticuerpos anti-SSEA-1, anti-integrin α6, y anti-integrin β1 (Fig. 3). No se detectó reactividad a anticuerpos SSEA-3 o SSEA-4. También se expresaron varios genes específicos de células madres (Oct-4, Nanog, Rex-1, Cipto, Dnmt3b, Lif Rc, Stat3, Bmp4, Fgf4, Foxd3, Sox2, CD9, and Gdf3) en las líneas. El origen de la creación celular fue determinado como una fertilización nor-

mal porque las células tenían cromosomas sexuales X e Y como es mostrado por la coexpresión de Zfy1 y Xist. Después del cultivo en medio libre de LIF, las células formadoras de colonias formaron EBs que fue positivo para marcadores de tres capas germinales (S-100, nestina, α-actina de músculo liso, desmina, α-fetoproteína, y troma-1; Fig 4). Las células formadoras de colonias transferidas a ratones inmunodeficientes, se transformaron en un teratoma constituido por células procedentes de las tres líneas germinales

### DISCUSIÓN

Solo han sido utilizados ovarios neonatales o prepuberales para extraer ovocitos intrafolliculares, lo que limita críticamente las aplicaciones clínicas de sistemas de cultivos de folículos preantrales. Nosotros hemos emprendido un estudio pre clínico usando un modelo con ratones para aumentar la viabilidad clínica de sistemas de cultivo folicular. Nuestros resultados sugieren que los folículos preantrales derivados de hembras completamente maduras pueden ser usados para generar ovocitos con capacidad de desarrollo. A pesar de que hubo una diferencia entre folículos preantrales y adultos, la extracción de ovocitos intrafolliculares de folículos adultos fue posible para iniciar su



<sup>1</sup> Kim. Culture of adult preantral follicle. Fertil Steril 2008

**Figura 2**

La obtención de ECSs (células madres embrionarias) derivadas de blastocistos de varios orígenes (A-E) o de activación partenogénica (F). Se observaron blastómeros uniformemente divididos con citoplasmas claramente definidos. Embriones derivados de FIV de dos células (A) y cuatro células (B), mórula (C), y expandido (D) y blastocisto haciendo hatching (E). Un blastocisto derivado de activación partenogénica. Bars = 50  $\mu$ m.

**Tabla 2**

Desarrollo de embriones derivados de activación partenogénica o FIV.

Embriones derivados de	N° (%) <sup>a</sup> de		N° (%) de ovocitos extraídos	N° de oocitos			
	cultivo folicular	fóliculos pseudo-antrales		maduros (%) <sup>a</sup>	activados/fertilizados	divididos (%) <sup>b</sup>	desarrollados <sup>a</sup> blastocistos (%) <sup>b</sup> .
Patenogénesis	78	71 (91)	75 (96)	62 (79)	62	12 (19) <sup>d</sup>	0 (0) <sup>d</sup>
FIV	186	178 (96)	176 (95)	N/A <sup>c</sup>	176	157 (89) <sup>e</sup>	72 (41) <sup>e</sup>

El efecto modelo de tratamiento que fue indicado como valor P fue de 0.1355, 0.6017, menos de 0.0001 y menos de 0.00001 en el número de folículos preantrales, en el número de folículos obtenidos, y en los divididos y desarrollados a blastocistos, respectivamente.

<sup>a</sup> Porcentaje del número de folículos cultivados

<sup>b</sup> Porcentaje del número de ovocitos activados o fertilizados in vitro

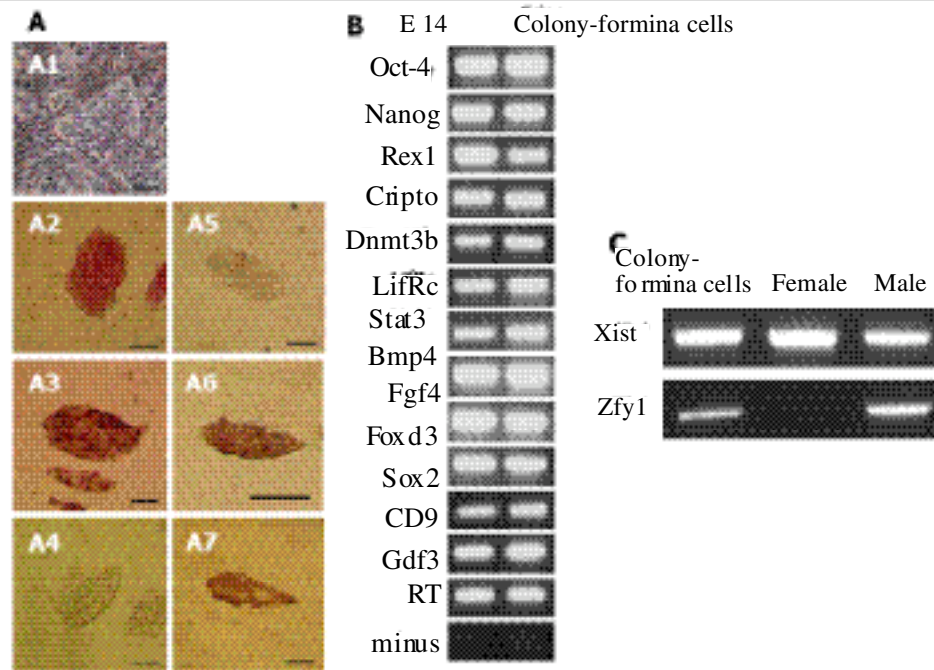
<sup>c</sup> La maduración de los ovocitos no es posible de monitorizar porque se utilizaron ovocitos cubiertos de cúmulus para fertilización in vitro.

<sup>d,e</sup> Diferentes superíndices dentro de la misma columna que fueron significativamente diferente,  $p < 0.05$

Kim. Culture of adult preantral follicle. Fertil Steril 2008

maduración in vitro. Extendiendo la duración del cultivo de folículos hasta los 13 días, se incrementó la formación de blastocistos de los ovocitos maduros a más de 40% después de FIV. Una línea de células tipo ESC fue obtenida de los blastocistos.

En general el envejecimiento y la maduración induce una variedad de cambios en el metabolismo celular (14-18), y ha sido reportado que células adultas acumulan sustancias relacionadas con la edad derivadas de distintas fuentes de daño celular y estrés que



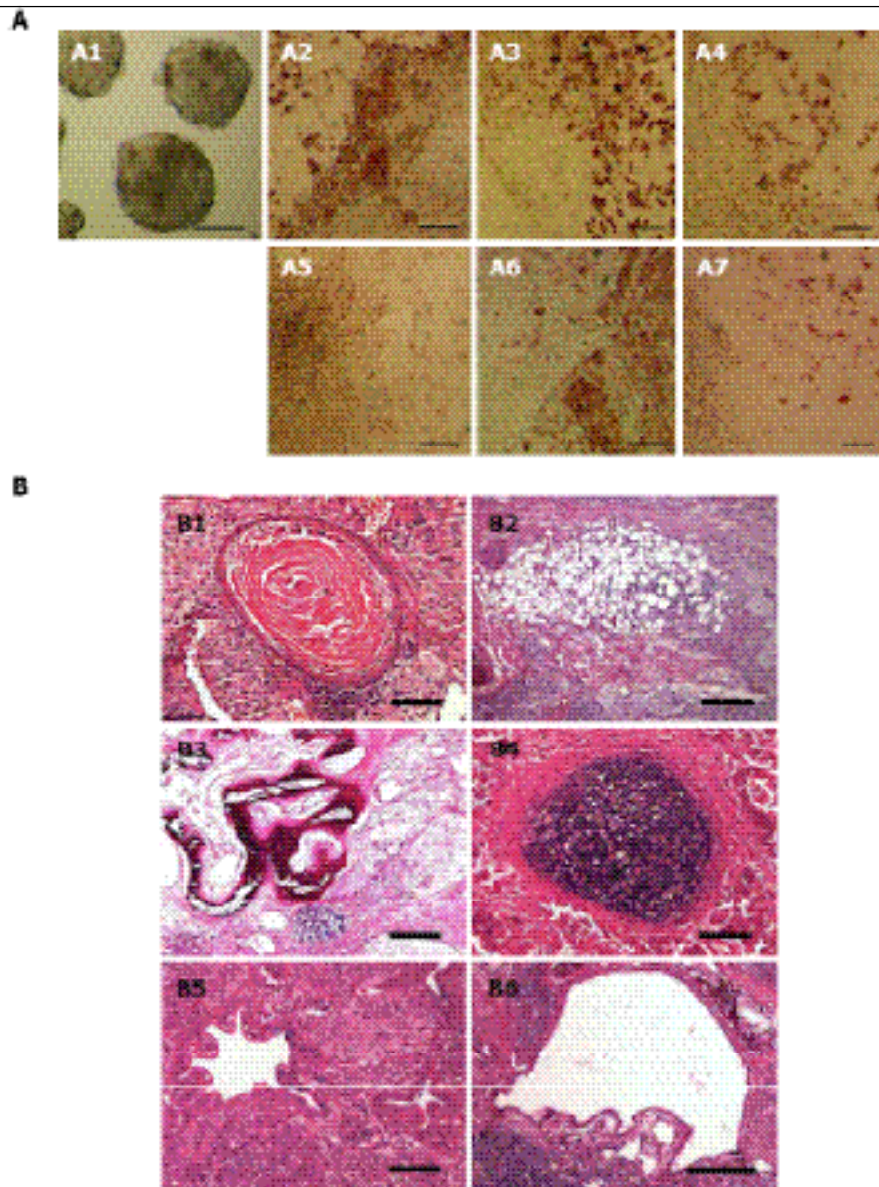
Kim. Culture of adult preantral follicle. Fertil Steril 2008

**Figura 3**

Caracterización de células formadoras de colonias derivadas de células subcultivadas de blastocistos ICM. Los blastocistos fueron generados por inseminación *in vitro* de ovocitos madurados dentro de folículos preantrales extraídos de ratones adultos B6CBAF1 de 8 semanas de vida y cultivados *in vitro*. (A) la morfología de células formadoras de colonias amplificadas 10 veces (A1) y tinción de las células formadoras de colonia con fosfatasa alcalina (A2) y anticuerpos anti-SSEA-1 (A3), anti-SSEA-3 (A4), anti-SSEA-4 (A5), anti-integrina  $\alpha 6$  (A6), y anti-integrina  $\beta 1$  (A7). Las células formadoras de colonias fueron positivas para SSEA-1, integrina  $\alpha 6$ , integrina  $\beta 1$ , y fosfatasa alcalina, sin embargo fueron negativas para SSEA-3 y SSEA-4. Bars = 50  $\mu$ m. (B) la expresión de genes específicos para células pluripotenciales en las células formadoras de colonias obtenidas fueron monitorizadas por reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa; las células formadoras de colonias expresaron genes específicos para ESC. (C) Se detectó la expresión específica para sexo Xist (específico del cromosoma X) y Zfy1 (específico del cromosoma Y) en las células obtenidas.

puede afectar la homeostasis fisiológica (19-23). De este modo pueden haber diferencias en las propiedades fisiológicas de los folículos extraídos de ovarios pre puberales y neonatales, así como en las condiciones óptimas de cultivo o en las sustancias requeridas para la supervivencia *in vitro* de los folículos preantrales adultos y entre ovarios neonatales y pre puberales. Anteriormente hemos reportado (6) que más de 100 folículos preantrales pueden ser aislados de un ratón pre púber. En este estudio aproximadamente 50 folículos preantrales fueron derivados de cada par de ovarios adultos (Fig. 1). Además, los ovocitos derivados de los folículos adultos se desarrollaron sólo hasta la etapa de ocho células después de la activación partenogénica y en ningún caso se detectó compactación de mórula o formación de blastocisto. Estos re-

sultados sugieren una reducción gradual en el número de folículos preantrales después del nacimiento (9-11), acompañado de una capacidad reducida de los ovocitos intrafoliculares de desarrollarse a embriones viables. En nuestro experimento adicional, aumentando la cantidad de FSH, la cual es crucial para la foliologénesis, en el líquido folicular no tiene efecto positivo (24). Hubo sin embargo una tendencia a una reducción de expresión de genes reguladores de la foliologénesis, aunque no se detectó diferencia estadísticamente significativa. No obstante ello un considerable número de folículos potencialmente formadores de ovocitos con capacidad de desarrollo fueron extraídos de los ovarios adultos. Estos resultados demuestran claramente que se puede expandir la reserva ovárica utilizando ovarios adultos.



Kim. Culture of adult preantral follicle. *Fertil Steril* 2008

#### Figura 4

Diferenciación espontánea de las células formadoras de colonia *in vitro* e *in vivo*. Las células formadoras de colonias fueron derivadas del subcultivo de células ICM de blastocistos generados por la inseminación *in vitro* de ovocitos madurados en cultivo *in vitro*. (A) diferenciación *in vitro* de células formadoras de colonias en EBs cultivándolas con medio libre de LIF. (A1) Cuerpo embrioide observado en día 4 de cultivo. Inmunocitoquímica fue usada para detectar la diferenciación de las tres capas germinales utilizando los marcadores S-100 (A2; ectodérmico), actina de músculo liso (A3; mesodérmico), nestina (A4; ectodérmico). Bars = 100  $\mu$ m. (B) Diferenciación *in vivo* de células formadoras de colonias transplantando subcutáneamente a ratones diabéticos no obesos (NOD) severamente inmunodeficientes. La tinción del teratoma con hematoxilina y eosina revela la presencia de (B1) epitelio escamoso con producción de queratina, (B2) tejido adiposo y muscular, (B3) óseo, (B4) cartílago, (B5) epitelio glandular, y (B6) epitelio ciliado. Bars = 50  $\mu$ m.



En un reporte previo usando ovarios pre puberales (7), la formación de blastocistos y la obtención de ESC fue posible cuando los ovocitos madurados en cultivo *in vitro* fueron sujetos a activación partenogénica. La partenogénesis en los ovocitos derivados de folículos adultos no fue tan efectiva como la de ovocitos derivados de folículos pre puberales y un número extremadamente pequeño de ovocitos se desarrollaron a blastocistos. Cuando los ovocitos derivados de folículos adultos fueron estimulados para desarrollo preimplantacional, FIV más frecuentemente que partenogénesis aumentó la capacidad de desarrollo de los ovocitos derivados de ovarios adultos. Estos resultados sugieren la existencia de diferentes requerimientos fisiológicos para folículos prepuberales y adultos para obtener ovocitos con capacidad de desarrollo.

Es difícil de sostener el crecimiento de los folículos preantrales extraídos de adultos, y pocos estudios han reportado el cultivo de folículos preantrales. Un éxito limitado ha sido reportado en el crecimiento de folículos preantrales extraídos de mujeres fértiles usando sistema de cultivo libre de suero (5). Previamente intentamos cultivar folículos preantrales en animales domésticos, los cuales fueron recogidos de ovarios adultos o envejecidos obtenidos de un matadero (25-26). En muchos casos un gran número de folículos preantrales fueron extraídos pero se detectó poco desarrollo. La mayoría de los folículos cultivados *in vitro* bloquearon su crecimiento antes de formar un pseudo-antró, y ninguno produjo ovocitos con capacidad de desarrollo. Reportes de otros grupos han demostrado también una diferencia en los requerimientos para el cultivo exitoso de folículos adultos (27-28). Una estrategia alternativa puede ser necesaria para cultivar folículos preantrales y obtener una producción eficiente de ovocitos con capacidad de desarrollo.

Muchos factores están envueltos en regular el crecimiento folicular. Debido a la falta de estimulación de la FSH durante la foliculogénesis *in vitro*, la presencia de FSH en el medio de cultivo parece ser esencial para el desarrollo folicular (29). Mejorando la expresión de los genes relacionados a la foliculogénesis evaluados puede contribuir también al desarrollo. El ligando C-kit induce el crecimiento de los ovocitos intrafoliculares aislados de ratones pre puberales (30). Se anunció recientemente que la interacción kit-kit ligando es una llave reguladora de la iniciación de crecimiento folicular (31). La hormona antimülleriana existe en ovocitos rodeados de cúmulus y está envuelta en el desarrollo folicular (32). El factor de crecimiento y diferenciación-9 está expresado durante

la foliculogénesis antes de la ovulación (33-34). Hay algunos miembros de la superfamilia del factor transformador de crecimiento, que juega un rol significativo en la foliculogénesis. El factor transformador de crecimiento, 1 controla el metabolismo de la glucosa en folículos cultivados *in vitro* (35), aunque otros factores paracrinos como el factor de crecimiento de Keratinocitos tiene una función anti apoptótica (36). Se ha propuesto la posibilidad de que estrógenos y el factor de crecimiento tipo insulina influyen en el crecimiento y maduración folicular (37-39). En este estudio usamos FSH y una extensión del período del cultivo para aumentar el crecimiento folicular preantral; sin embargo no se detectó ninguna respuesta en los folículos al incrementar la concentración de FSH en el medio de cultivo (experimento adicional). Esto sugiere que los folículos preantrales extraídos de animales sexualmente maduros tienen sensibilidad reducida a gonadotropinas exógenas. Esto sostiene que la estimulación de los folículos con FSH no promueve crecimiento folicular.

Anteriormente hemos reportado que en ratones pre puberales, 9 días era el período de cultivo óptimo para el crecimiento de folículos preantrales capaces de producir ovocitos con capacidad de desarrollo (7). En este estudio, la extensión del período de cultivo a 13 días aumentó la capacidad de desarrollo de los ovocitos intrafoliculares como así también el crecimiento de folículos preantrales adultos. En los folículos adultos, sin embargo, la extensión en el período de cultivo a 13 días no pudo sobreponer la inferioridad de desarrollo-arresto de los ovocitos intrafoliculares. Por ello una optimización futura utilizando un medio de cultivo diferente puede ser necesaria para sostener el crecimiento de ovocitos maduros en embriones viables después de la fertilización. Las interacciones célula-célula (40-41) o la presencia de sustancias bioactivas exógenas en el sistema de cultivo (3, 4, 37-39) puede facilitar el desarrollo de folículos *in vitro*. El uso de un sistema de cocultivo puede ayudar a aumentar la capacidad de desarrollo de los ovocitos derivados de folículos adultos.

En conclusión, a pesar que hay limitaciones para el crecimiento *in vitro* y la obtención de folículos de ovarios adultos, los folículos extraídos de ovarios completamente maduros pueden ser usados para generar ovocitos con capacidad de desarrollo. Comparado con folículos juveniles, sin embargo, es necesaria una estrategia diferente para obtener ovocitos con capacidad de desarrollo a través de la manipulación efectiva de los folículos preantrales adultos. Un programa optimizado para cultivo de folículos preantrales adultos puede contribuir al desarrollo de

técnicas de reproducción asistida para el tratamiento de infertilidad idiopática y relacionada a problemas ováricos. Esto puede también promocionar el desarrollo de terapias celulares paciente-específicas usando ESCs autólogas capaces de generar células diploides pluripotenciales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Eppig JJ, Schroeder AC.:** Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in-vitro. *Biol Reprod* 1989; 41: 268-76.
2. **Cortvrint R, Smitz J, Van Steirteghem AC.:** In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 1996; 12: 759-68.
3. **Grupta PS, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP.:** Production of buffalo embryos using oocytes from in viro grown preantral follicles *Zygote* 2008; 16: 57-63.
4. **Zhao J, Dorland M, Taverne MAM, Van Der Weijden GC, Bevers MM, Van Den Hurk R.:** In vitro culture of rat pre-antral follicles with emphasis on follicle interaction. *Mol Reprod Dev* 1999; 55: 65-74.
5. **Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ.:** A two-step serumfree culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod* 2008; 23: 1151-8.
6. **Lee ST, Choi MH, Gong SP, Han JY, Lim JM.:** Establishment of a basic method for manipulating preantral follicles: effects of retrieval method on in vitro growth of preantral follicles and intrafollicular oocytes. *Zygote* 2007; 15: 109-16.
7. **Lee ST, Choi MH, Lee EJ, Gong SP, Jang M, Park SH, et al.:** Establishment of autologous embryonic stem cells derived from preantral follicle culture and oocyte parthenogenesis. *Fertil Steril* 2007; 88: 1193-203.
8. **Gong SP, Lee EJ, Lee ST, Kim H, Lee SH, Han HJ, et al.:** Improved establishment of autologous stem cells derived from preantral follicle culture and oocyte parthenogenesis. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 695-712.
9. **O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ.:** A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 2003; 68: 1682-6.
10. **Hirshfield AN.:** Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43-101.
11. **Hartshome GM.:** In vitro culture of ovarian follicles. *Rev Reprod* 1997; 2: 94-104.
12. **Lenie S, Cortvrint R, Adriassens T, Smitz J.:** A reproducible two step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Bio Reprod* 2004; 71: 1730-8.
13. **Nayudu PL, Osborn SM.:** Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 349-62.
14. **Tatone C, Carbone MC, Gallo R, Delle Monache S, Di Cola M, Alesse E, et al.:** Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory in vitro culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biol Reprod* 2006; 74: 395-402.
15. **Hall DM, Xu L, Drake BJ, Oberley LW, Oberley TD, Moseley PL, et al.:** Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress. *J Appl Physiol* 2000; 89: 749-59.
16. **Kregel KC, Moseley PL, Skidmore R, Gutierrez JA, Guerriero V.:** HSP70 accumulation in tissues of heat-stressed rats is blunted with advancing age. *J Appl Physiol* 1995; 79: 1673-8.
17. **Wu B, Gu MJ, Heydari AR, Richardson AR.:** The effect of age on the synthesis of two heat shock proteins in the HSP70 family. *J Gerontol* 1993; 48: 50-6.
18. **Skidmore R, Gutierrez JA, Guerriero JV, Kregel KC.:** HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am J Physiol* 1995; 268: 92-7.
19. **Berlett BS, Stadman ER.:** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-6.
20. **Squier TC.:** Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1539-50.
21. **Lee HC, Wei YH.:** Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging. *Biogerontology* 2001; 2: 231-44.
22. **Wei YH, Lee HC.:** Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med* 2002; 227: 671-82.
23. **Wei YH.:** Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 53-63.
24. **Chun SY, Eisenhauser KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ.:** Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 1996; 137: 1447-56.
25. **Choi MH, Oh JH, Kim TM, Han JY, Lim JM.:** Morphological criteria of bovine ovaries for predicting retrieval efficiency of preantral follicles. *Asian Aust J Anim Sci* 2006; 19: 1711-5.
26. **Choi MH, Gong SP, Lim JM.:** Retrieval of porcine ovarian follicles by different methods. *Asian Aust J Anim Sci* 2008; 21: 353-7.
27. **Mao J, Wu G, Smith ME, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, et al.:** Effects of culture medium, serum

- type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biol Reprod* 2002; 67: 1197-203.
28. **Gupta PS, Nandi S, Ravindranatha BM, Sarma PV.:** In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Theriogenology* 2002; 57: 1839-54.
  29. **Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM.:** Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 1997; 15: 201-4.
  30. **Packer AI, Hsu YC, Besmer P, Bach va rova RF.:** The ligand of the ckit receptor promotes oocyte growth. *Dev Biol* 1994; 161: 194-205.
  31. **Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J.:** Roles of Kit and Kit ligand in ovarian function. *Rev Reprod* 2000; 5: 143-52.
  32. **Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al.:** Anti-Mulleian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1076-84.
  33. **Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM.:** The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1809-17.
  34. **McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ.:** Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 131-6.
  35. **Roy SK, Terada DM.:** Activities of glucose metabolic enzymes in human preantral follicles: in vitro modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and transforming growth factor beta 1 *Biol Reprod* 1999; 60: 763-8.
  36. **Markstrom E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billing H.:** Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; 123: 23-30.
  37. **Lenie S, Smith Z.:** Estrogen receptor subtypes localization shifts in cultured mouse ovarian follicles. *Histochem Cell Biol* 2008; 129: 827-40.
  38. **Zhao J, Taverne MA, Van Der Weijden GC, Bevers NM, Van Den Hurk R.:** Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat preantral follicles. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 287-96.
  39. **Yang MY, Fortune JE.:** The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during midgestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod* 2008; 78: 1153-61.
  40. **Heng BC, Tong GQ, Ng SC.:** Effects of granulosa coculture on in-vitro oocyte meiotic maturation within a putatively less competent murine model. *Theriogenology* 2004; 62: 1066-92.
  41. **Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieka A, Day BN.:** Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol Reprod* 1998; 58: 213-8.