

Cultivo folicular *in Vitro* *In Vitro* follicle culture

Clara González, Montserrat Boada, Marta Devesa, Buenaventura Coroleu, Anna Veiga.
Institut Universitari Dexeus, Barcelona. España. Servicio de Medicina de la Reproducción. Departamento de Ginecología, Obstetricia y Reproducción. Institut Universitari Dexeus. Barcelona, España.

RESUMEN

Los tratamientos de quimioterapia y radioterapia recibidos en distintas neoplasias u otras patologías (enfermedades autoinmunes, síndromes mielodisplásicos), pueden provocar problemas reproductivos debido a los daños provocados en las células reproductoras, especialmente en las gónadas femeninas. Antes de someter a las pacientes a tratamientos oncológicos es importante recurrir a técnicas que permitan preservar su fertilidad. La congelación de tejido ovárico para ser trasplantado posteriormente es una opción a considerar en niñas o mujeres jóvenes. Otra opción la constituye la maduración *in Vitro* de folículos del tejido previamente congelado que evitaría además el riesgo de reintroducir células malignas durante el trasplante. Aunque se han logrado mantener cultivos foliculares hasta estadios antrales, se necesita una mejora en el conocimiento de la fisiología del folículo así como de los métodos de cultivo *in Vitro* con el fin de lograr resultados que puedan aplicarse en la práctica clínica.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2011; 28: 93-99 ©2011 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Palabras clave: *foliculogénesis, maduración in Vitro.*

SUMMARY

Chemotherapy and radiotherapy treatments administered in different neoplasms or other pathologies (auto-immune diseases, myelodysplastic syndrome) may cause reproductive problems due to damage in germ cells, especially in the female gonads (ovaries). It is important to apply techniques that will allow fertility preservation before patients undergo oncologic treatment. Ovarian tissue cryopreservation for subsequent transplantation is an option to be considered for girls or young women. Another option is *in Vitro* maturation of follicles using the previously cryopreserved tissue which would avoid inserting malignant cells during the transplant. Although *in Vitro* culture of follicles have been developed to antral stages, it is necessary to further our knowledge in follicular physiology and *in Vitro* culture methods in order to achieve results that can be applied in clinical practice.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2011; 28: 93-99 ©2011 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Key words: *follicle-genesis, in Vitro maturation*

Aceptado 15 Febrero 2011

Autor para correspondencia: Clara González. Institut Universitari Dexeus. Gran Vía Carles III 71-75. 08028 Barcelona, España.

Email: clagon@dexeus.com

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Secretaría general: Luis A. Quintero. Apdo. Correos 87. 46110 Godella (Valencia) España. Email: contacto@editorialmedica.com

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de ovocitos y de embriones tras fecundación *in Vitro* (FIV) previa al tratamiento antineoplásico constituyen los métodos que habitualmente se utilizan en los tratamientos de preservación de la fertilidad en mujeres adultas. Otra de las opciones es la congelación de tejido ovárico, utilizada sobretudo en niñas y mujeres jóvenes. Hay que tener en cuenta que la criopreservación y cultivo del ovario entero se hace inviable debido a su gran tamaño. El trasplante de fragmentos de tejido ovárico es una buena opción para la preservación de la fertilidad a pesar de haberse realizado en un número reducido de casos (1). Esta técnica se está optimizando en numerosos grupos clínicos. Se ha demostrado que el trasplante de tejido ovárico puede restaurar la fertilidad (2, 3) aunque existe un cierto riesgo de reintroducir células malignas tras el trasplante, sobretudo en determinados tipos de cáncer (mama, leucemia, neuroblastoma). Por este motivo, se están desarrollando distintos protocolos para el cultivo *in Vitro* de folículos inmaduros y permitir así la obtención de ovocitos aptos para ser fecundados, lograr un correcto desarrollo embrionario que dé lugar a embriones con capacidad de implantación tras la transferencia.

En otras áreas de investigación, podría también ser útil lograr el crecimiento y maduración folicular *in Vitro* en estudios sobre la acción de fármacos en el ovario o en el cultivo de ovocitos para generar bancos de gametos de animales en peligro de extinción.

Se han llevado a cabo un gran número de estudios sobre maduración *in Vitro* de folículos en distintos modelos animales. En 1996, Eppig & O'Brien lograron el crecimiento de folículos primordiales en cultivo y, tras fecundación *in Vitro* y transferencia embrionaria, lograron el nacimiento de un ratón sano (4). El modelo del ratón ha servido para estudiar algunos principios básicos de crecimiento y formación del folículo, el proceso de imprinting y también ha permitido la identificación de factores de crecimiento y diferenciación (5). Muruvi y col. en 2009 consiguieron que folículos primarios de oveja aislados y cultivados *in Vitro* alcanzasen estadios de folículo secundario (6). Recientemente, Mc Laughlin y col. (2010) han logrado obtener ovocitos de >100µm de diámetro tras 15 días de cultivo a partir de folículos primordiales en bovinos (7). En cerdo, Wu y col. lograron el crecimiento de folículos preantrales hasta estadio antral tras cultivo *in Vitro* (8).

En la especie humana, combinando el cultivo de fragmentos de corteza ovárica con el cultivo de folículos aislados se ha logrado el crecimiento de folículos primordiales y

primarios hasta estadios secundarios y antrales (9,10). La limitada disponibilidad de tejido ovárico para investigación hace que los avances en cultivo folicular *in Vitro* sean lentos. Además, la complejidad *per se* del desarrollo folicular *in vivo*, dificulta el diseño de un sistema de cultivo *in Vitro* que permita el crecimiento completo de los ovocitos de los folículos primordiales o primarios. Todavía falta dilucidar muchos factores que intervienen en el inicio del crecimiento folicular, las condiciones de cultivo, el *turnover* metabólico y el ambiente fisiológico que permite el desarrollo correcto del folículo.

El objetivo de este trabajo es revisar el conocimiento actual acerca de los métodos de aislamiento y cultivo folicular *in Vitro* y evaluar sus aplicaciones en técnicas de reproducción asistida.

FOLICULOGÉNESIS IN VIVO

En la especie humana, las células germinales primordiales aparecen en el feto femenino aproximadamente a las 3 semanas de haberse producido la fecundación y migran desde el epitelio de la vesícula vitelina hacia la cresta genital. Una vez allí, las células germinales primordiales reciben el nombre de ovogonias. Durante el proceso de migración, la actividad mitótica de estas células es muy elevada (11).

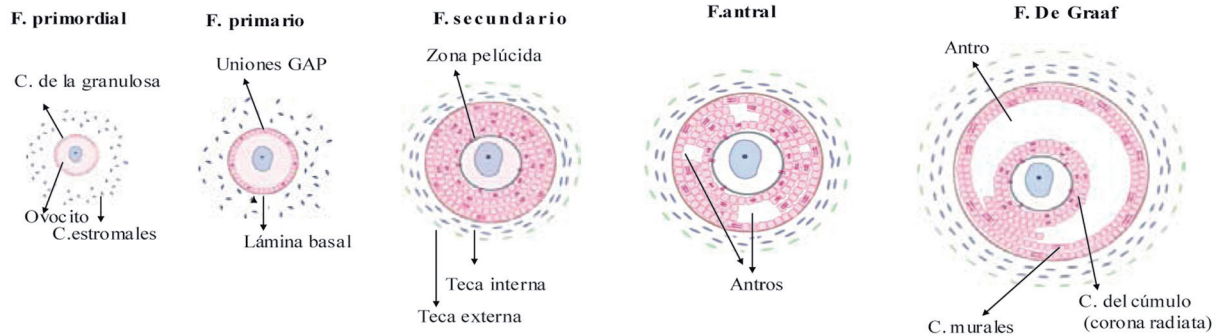
Cerca del tercer mes de gestación se concentran las células somáticas mesenquimales alrededor de las ovogonias formándose los folículos primordiales. Entre la semana 12-13 de gestación, las ovogonias inician la meiosis quedando bloqueadas en la profase I de la primera división meiótica (estadio de diplotene). En torno a las 20 semanas de gestación, la dotación inicial de folículos primordiales alcanza su número máximo (7×10^6) el cual se reduce drásticamente al nacer, siendo de aproximadamente de $1-2 \times 10^6$ (12). En el momento del nacimiento los ovocitos se encuentran bloqueados en estadio de diplotene de la primera división meiótica. Los cromosomas están descondensados y empaquetados en el núcleo al cual se le denomina vesícula germinal (VG).

Desde el nacimiento hasta la menopausia y de forma continua, se desarrollan grupos de folículos primordiales. Estos folículos están destinados a la atresia hasta que no reciben el estímulo gonadotrófico suficiente. A partir de la pubertad, los pulsos de hormona foliculoestimulante (FSH) permiten que estos grupos de folículos primordiales se activen iniciando la fase de crecimiento, reiniciándose la meiosis en el folículo que se desarrolla en cada ciclo menstrual.

Se conoce por **foliculogénesis** el proceso mediante el cual los folículos primordiales crecen y se diferencian hasta folículo

FIGURA 1

Estadios de los folículos durante la foliculogénesis y factores implicados en el crecimiento y maduración folicular.



Reclutamiento inicial ~ 120d	Reclutamiento cíclico	
	Selección ~ 80d	Dominancia-ovocitación ~ 14d
<p>Control paracrino. Independiente de gonadotropinas. KL transición folículos primordiales → primarios ↑ crecimiento y maduración ovocitaria FGF ↑ mitosis ↑ diferenciación cels granulosa GDF9 + BMP15 ↑ proliferación cels granulosa Insulina, Activinas ↑ proliferación celular y estereoidogénesis HAM ⊖ reclutamiento inicial</p>	<p>Control endocrino. FSH dependiente. FSH formación de antros LH maduración ovocitaria Inhibina B + estrógenos → feedback - sobre hipófisis GF's ⊖ apoptosis, ↑ angiogénesis</p>	
<p>KL: <i>kit ligand</i>; FGF: <i>fibroblast growth factor</i>; GDF9: <i>growth differentiation factor -9</i>; BMP15: <i>bone morphogenetic protein 15</i>; HAM: <i>hormona antimülleriana</i>; FSH: <i>follicle stimulating hormone</i>; LH: <i>hormona luteinizante</i>; GF's: <i>growth factors</i> ↑ activa; ⊖ inhibe</p>		

preovulatorio o folículo de Graaf. En las primeras etapas de este proceso, los folículos primordiales se activan cuando las células somáticas que rodean al ovocito se hacen cuboidales e incrementan su actividad proliferativa, formando una capa de células de la granulosa. A partir de este momento al folículo primordial se le denomina **folículo primario**.

Cuando el folículo primario alcanza un diámetro de 200-250µm y las capas de células de la granulosa son numerosas, se denomina **folículo secundario**¹³. Las células del estroma ovárico circundantes a la membrana basal se diferencian y son denominadas células de la teca interna, mientras que las más alejadas reciben el nombre de teca externa. Entre las células de la granulosa y el ovocito existen uniones intercelulares tipo *gap* que facilitarán la comunicación bidireccional y permitirán el paso de nutrientes, precursores metabólicos y factores de crecimiento. El ovocito en el interior del folículo aumenta de tamaño y secreta las glicoproteínas que constituirán la zona pelúcida. Las células de la granulosa proliferan y empiezan a expresar

receptores para la FSH y las células de la teca continúan su diferenciación, expresando receptores para la hormona luteinizante (LH). Estos fenómenos junto con la acumulación de líquido folicular en los espacios intercelulares de las células de la granulosa convierten al folículo secundario en **folículo antral**.

Durante la fase folicular del ciclo menstrual numerosos folículos antrales van aumentando de tamaño hasta que uno de ellos crece por encima de los demás (fenómeno de selección y dominancia) entrando los otros en atresia. Este folículo dominante liberará un ovocito en estadio de metafase II tras el pico endógeno de LH.

El **folículo preovulatorio** o **folículo de Graaf** alcanza un tamaño de 20-25mm en el momento de la ovulación y se caracteriza por la existencia de una única cavidad rellena de líquido folicular o antro. El ovocito en su interior está rodeado por células de la granulosa especializadas, llamadas células del cúmulo que son funcionalmente distintas

de las células de la granulosa que tapizan el antro (células murales).

Se estima que en la especie humana el tiempo que tarda un folículo primario en llegar a estadio secundario es de aproximadamente 120 días, el folículo secundario tarda 60-80 días en crecer hasta folículo antral y éste tarda 14 días en denominarse folículo preovulatorio o folículo de Graaf (14). (Figura 1)

Regulación del crecimiento folicular y maduración ovocitaria.

Existen diversos factores autocrinos, paracrinos y endocrinos que regulan el crecimiento y desarrollo folicular así como la maduración ovocitaria. Entre los factores que influyen en la transición de **folículos primordiales a primarios** se encuentra la proteína *kit ligand* (KL) y el factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF) el cual estimula la mitosis y promueve la diferenciación de las células de la granulosa (15). La insulina también participa promoviendo la esteroidogénesis en las células de la granulosa y de la teca.

La hormona antimülleriana (HAM) producida por las células de la granulosa tiene un efecto inhibitorio en el reclutamiento inicial de folículos primarios a partir del *pool* de folículos primordiales (16). En la transición de **folículos primarios a secundarios** el ovocito juega un papel importante ya que produce factores implicados en el crecimiento folicular y la maduración ovocitaria como el FGF, el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF 9) y la *bone morphogenetic protein 15* (BMP 15), que estimulan la proliferación de las células de la granulosa (17). El KL favorece el crecimiento del ovocito y su maduración citoplasmática mientras que las activinas secretadas por las células de la granulosa promueven la proliferación celular y la esteroidogénesis (18). Los esteroides condicionan la concentración de receptores de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). A partir del estadio de **folículo preantral**, el crecimiento folicular es dependiente de la acción de las gonadotropinas circulantes. La FSH recluta folículos precursores que comienzan su desarrollo preovulatorio, aunque finalmente sólo uno de ellos logre completar el crecimiento e inicie la maduración preovulatoria (fenómeno de selección y dominancia). Además, la FSH estimula la división de las células de la granulosa y la formación de líquido en los antros foliculares. También promueve la secreción de inhibina folicular por parte de las células de la granulosa que junto con los estrógenos producen el fenómeno de *feed back* negativo sobre la secreción de FSH por la hipófisis. El folículo que mejor responda a la FSH será el folículo dominante que crecerá y secre-

tará estrógenos, mientras que los demás entrarán en atresia. La LH tiene un papel fundamental en el proceso del crecimiento folicular, dominancia y maduración ovocitaria. Esta hormona actúa sobre las células de la teca activando la síntesis de andrógenos que, por acción de la aromatasa, se convierten en estrógenos en las células de la granulosa.

Sin embargo, niveles demasiado elevados de LH pueden tener un efecto inhibitorio del crecimiento folicular (12). En el folículo antral también existen factores intrafoliculares locales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de la insulina (IGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), el FGF-2, y la interleucina $-\beta$ los cuales inhiben los mecanismos de apoptosis. El *vascular endothelial growth factor* (VEGF) es un promotor de la angiogénesis, lo que maximiza la influencia de las gonadotropinas sobre este folículo (19). El pico preovulatorio de LH desencadena la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito in vivo: tiene lugar la *germinal vesicle breakdown* (GVBD) completándose así la primera división meiótica para progresar a estadio de metafase II y se recluta mRNA para la síntesis de determinadas proteínas que serán necesarias para sostener las futuras divisiones mitóticas del embrión. La LH también promueve la expansión del cúmulo oóforo, y sus células secretan ácido hialurónico que formará una matriz mucosa necesaria para la extrusión del ovocito del folículo en el momento de la ovocitación.

CULTIVO FOLICULAR IN VITRO

En mujeres tratadas con quimio y radioterapia de las que se dispone de tejido ovárico criopreservado y no se desea realizar trasplante de dicho tejido, el cultivo folicular *in Vitro* constituye una alternativa a tener en cuenta. En los años noventa se empezaron a desarrollar técnicas de cultivo folicular *in Vitro* en humanos. El objetivo de esta técnica es obtener folículos antrales a partir de los folículos primordiales y primarios presentes en la corteza ovárica en condiciones de laboratorio. Existen dos métodos distintos, el primero de los cuales consiste en el trasplante de una suspensión de folículos aislados previamente madurados *in Vitro* mientras que el segundo método consistiría en el cultivo *in Vitro* de folículos aislados hasta la obtención de ovocitos en metafase II.

Aislamiento folicular

Una vez los folículos primordiales han iniciado su crecimiento, éstos pueden aislarse y continuar el cultivo como folículos individuales, rodeados por la lámina basal y algunas células del estroma ovárico. Lograr aislar folículos sin alterar su viabilidad es de vital importancia para realizar un correcto cultivo *in Vitro*. El aislamiento de folículos puede realizarse

mecánicamente (tijeras, bisturí, aguja) o enzimáticamente. La ventaja del sistema mecánico es que la membrana basal del folículo permanece intacta y que las células de la teca permanecen adheridas a éste, ambos indispensables para el correcto desarrollo del folículo *in Vitro*. Sin embargo, este método es laborioso y presenta un bajo rendimiento en tejidos fibrosos como el tejido ovárico humano.

La digestión enzimática disgrega la matriz extracelular de manera que los folículos pueden ser aislados más fácilmente con la ayuda de agujas. Un inconveniente importante de este método es que si el tiempo de exposición enzimática es muy prolongado, se separan las células de la teca del folículo y puede deteriorarse la membrana basal. Al separarse las células de la teca, los cultivos se convierten entonces en cultivos de complejos ovocito-células de la granulosa en lugar de cultivos de folículos íntegros. El daño en la membrana basal puede provocar una migración espontánea de las células de la granulosa del ovocito y esto afecta directamente al crecimiento y desarrollo del ovocito al perder la estructura tridimensional.

Demeestere y col. en 2002 compararon el efecto del aislamiento mecánico y enzimático sobre folículos de ratón, que cultivaron durante 12 días (20). Aunque el método enzimático proporcionó folículos con mayor número de células de la teca que produjeron mayor concentración de estradiol, los dos métodos de aislamiento folicular proporcionaron unas tasas de maduración ovocitaria similares.

En 2004, Martínez-Madrid y col. describieron la posibilidad de recuperar folículos humanos aislados mecánica y enzimáticamente utilizando un gradiente discontinuo de Ficoll²¹. En su estudio, cortaron fragmentos de tejido ovárico con un disecionador de tejidos y los incubaron con colagenasa. La mezcla resultante se centrifugó con gradientes de Ficoll. El 99.9% de los folículos recuperados se situaban en las interfases de los gradientes. El análisis por tinción fluorescente mostró que el 95.8% de los folículos recuperados eran viables.

Dolmans y col. en 2006 desarrollaron un método de aislamiento enzimático que consistía en incubar fragmentos de tejido ovárico humano con liberasa en lugar de utilizar colagenasa (22). La incubación con liberasa permitió aislar menor cantidad de folículos que la colagenasa pero éstos presentaban mejor morfología, viabilidad y ultraestructura.

Métodos de cultivo folicular

Distintos autores han publicado metodologías para el cultivo de folículos *in Vitro*. La metodología descrita por Ho-

vatta y col.(23) en 1997 describía la utilización de soportes porosos (millicell inserts, Millipore) cubiertos con matriz extracelular sintética (Matrigel, Millipore) para cultivar fragmentos de tejido ovárico. El medio de cultivo empleado (MEM con glutamato, HSA, FSH, una mezcla de insulina/transferrina y selenio y antibióticos/antimicóticos). Una incubación durante 7-21 días permitió un incremento significativo de crecimiento folicular hasta estadios secundarios. Este mismo grupo describió que el cocultivo con AMPc o GDF-9 promovía una mayor tasa de crecimiento de folículos hasta estadios secundarios obteniendo una mayor proporción de folículos viables (24, 25). También se observó en otro estudio que la presencia de HAM inhibía el crecimiento folicular en los estadios más tempranos (26).

Telfer y col.(9) en 2008 diseñaron un método de cultivo folicular en dos pasos: primero cultivaron fragmentos de tejido ovárico humano en placas multipocillo con medio de cultivo tamponado y suplementado (McCoy's medium, BSA, glutamina, antibióticos, transferrina, selenio, insulina y ácido ascórbico). Cultivaron durante 6 días y tras observar crecimiento folicular, aislaron los folículos mecánicamente. Una vez aislados, seleccionaron los folículos con un diámetro de aproximadamente 100µm (±3.4) con ovocito visible, membrana basal intacta y sin cavidad antral y los cultivaron 4 días. En los días 2 y 4 de cultivo midieron el diámetro de los folículos observando crecimiento acelerado hasta estadio antral. Este es el primer estudio en la especie humana que demuestra que folículos primordiales pueden crecer hasta estadios antrales en un cultivo *in Vitro* de 10 días de duración.

Hay que tener en cuenta que en condiciones *in vivo*, los folículos están integrados en la matriz extracelular (ECM), que consiste en un complejo tridimensional de fibras y huecos que facilita la comunicación entre el folículo y el entorno ovárico. Para simular este fenómeno, debería disponerse de matrices extracelulares sintéticas tridimensionales o *scaffolds* que soportasen el crecimiento facilitando la comunicación intercelular y permitiendo la organización y la diferenciación de los folículos. West y col. en 2007 evaluaron la eficacia de diferentes hidrogeles para el cultivo folicular (27). En su estudio vieron que materiales como el colágeno y el Matrigel permitían la expansión del folículo en crecimiento pero las enzimas necesarias para su degradación dañaban el folículo. Por otra parte, el alginato, polímero natural producido por una alga parda, demostró poseer propiedades óptimas para ser utilizado como scaffold en el cultivo folicular *in Vitro* (28).

Resultados similares fueron obtenidos por Amorim y col. en 2009 al cultivar folículos preantrales humanos aislados

en una matriz de alginato. El 90% de los 159 folículos cultivados sobrevivieron al cultivo y se observó crecimiento en todos ellos (29).

Un aspecto importante a tener en cuenta en los cultivos foliculares *in Vitro* es el posible efecto de éstos sobre el imprinting en los ovocitos. La información epigenética se adquiere durante la gametogénesis, de ahí la enorme relevancia de los cultivos que sostienen la foliculogénesis y la maduración *in Vitro* de ovocitos para evitar desórdenes de imprinting de origen materno (30). Poirot y col. en 2003 analizaron en el modelo de ratón el efecto del cultivo *in Vitro* sobre el imprinting. Analizaron la metilación del ADN en distintos genes en ovocitos en estadio de vesícula germinal obtenidos a partir de cultivo *in Vitro* de folículos preantrales. Al comparar el patrón de metilación de estos ovocitos con ovocitos control, detectaron ganancia y/o pérdida de grupos metilo en los distintos genes analizados, demostrando que el cultivo *in Vitro* afectaba la reprogramación nuclear (31).

Una reciente publicación de Anckaert y col. sostiene que un cultivo prolongado de ovocitos de ratón no supone ninguna modificación en el patrón de impronta genómica (32). En su estudio examinaron el patrón de metilación de ciertos genes de ovocitos metafase II obtenidos tras el cultivo de folículos preantrales y maduración *in Vitro* y mostraron patrones de metilación del ADN similares a los controles. Es imprescindible asegurar condiciones de cultivo *in Vitro* que no comprometan el correcto desarrollo del ovocito en cuanto a fenómenos de impronta genética para plantear su posible utilización clínica.

Los métodos de cultivo folicular *in Vitro* han permitido el crecimiento de folículos primordiales y primarios hasta estadios antrales, aunque el ritmo de crecimiento es superior al que se produce *in vivo*.

CONCLUSIONES

Aunque el cultivo folicular *in Vitro* presenta muchos beneficios potenciales, existen todavía muchos aspectos a clarificar. La maduración de folículos *in Vitro* a partir de fragmentos de tejido ovárico debe permitir la obtención de ovocitos aptos para ser fecundados y que los embriones resultantes se desarrollen correctamente. La complejidad de dicho proceso *in vivo* requiere seguir investigando para optimizar la metodología *in Vitro* antes de plantear su posible aplicación terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Donnez J, Samuel Kim S, Albertini D.: Proceedings of the First World Congress on Fertility Preservation: executive summary.** J Assist Reprod Genet. 2010; 27:191-195.

2. **Tryde Schmidt KL, Yding Andersen C, Starup J, Loft A, Byskov AG, Nyboe Andersen A.: Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - follicular growth, steroid production and oocyte retrieval.** Reprod Biomed Online 2004 Apr; 8(4):448-53.
3. **Donnez J, Squifflet J, Van Eyck AS, Demyelle D, Jadoul P, Van Langendonck A, et al.: Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience.** Reprod Biomed Online 2008 May; 16 (5):694-704.
4. **Eppig J, O'Brien MJ.: Development in Vitro of mouse oocytes from primordial follicles.** Biol Reprod. 1996;54:197-207.
5. **Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, et al.: Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in Vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation.** Hum Reprod Update. 2010; 16(4):395-414.
6. **Muruvi W, Picton HM, Rodway RG, Joyce IM.: In Vitro growth and differentiation of primary follicles isolated from cryopreserved sheep ovarian tissue.** Anim Reprod Sci. 2009;112: 36-50.
7. **Mc Laughlin M, Telfer E.: Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two step serum free culture system.** Reproduction 2010;139: 971-978.
8. **Wu J, Emery BR, Carrell DT.: In Vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles.** Biol Reprod. 2001; 64: 375-381.
9. **Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Joo Thong K.: A two-step serum free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin.** Hum Reprod. 2008;23:1151-1158.
10. **Hovatta O.: Cryopreservation and culture of human primordial and primary ovarian follicles.** Mol Cell Endocrinol. 2000;169:95-97.
11. **Smitz J, Cortvrindt RG.: The earliest stages of folliculogenesis in Vitro.** Reproduction 2002;123:185-202.
12. **Fábregas F, Balasch J.: Foliculogénesis: Papel de la FSH y la LH. En: Bajo Arenas JM; Coroleu Lletget B. (Eds): Fundamentos de reproducción. Madrid, Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia; 2009. p. 23-28.**
13. **Abir R, Nitke S, Ben-Haroush A, Fisch B.: In Vitro maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation.** Histol Histo-pathol. 2006; 21:887-898.
14. **Pellicer A, Japur de Sá Rosa e Silva AC, Rosa e Silva JC.: Aspectos fisiológicos de la LH en la foliculogénesis. En: García Velasco JA, (Ed): Papel de la LH. Cuadernos de Medicina Reproductiva. Madrid, Adalia Farma, 2005. p. 17-26.**
15. **Carlsson IB, Laitinen MP, Scott JE, Louhio H, Velentzis L, Tuuri T, Aaltonen J, Ritvos O, Winston RM & Hovatta O.: Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture.** Reproduction 2006; 131: 641-649.
16. **Bonilla-Musoles F, Castillo JC, Caballero O, Raga F, Bonilla F,**

-
- Dolz M.:** Hormona Antimülleriana; un marcador directo predictivo en reproducción asistida: I- Envejecimiento ovárico. *Rev. Iberoamer. Fertil.* 2010;27: 5-12.
17. **Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT.:** Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82:431-46.
 18. **Thomas FH, Ismail RS, Jiang JY, Vanderhyden BC.:** Kit ligand 2 promotes murine oocyte growth in Vitro. *Biol Reprod.* 2008;78:167-75.
 19. **Hsieh M, Zamah AM, Conti M.:** Epidermal Growth Factor-Like Growth Factors in the Follicular Fluid: Role in Oocyte Development and Maturation. *Semin Reprod Med.* 2009; 27:52-61.
 20. **Demeestere I, Delbaere A, Van den Bergh M, Devreker F, Englert Y.:** Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Hum Reprod.* 2002; 17 (8):2152-2159.
 21. **Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrère S, Van Eyck AS & Donnez J.:** Ficoll density gradient for recovery of isolated human ovarian primordial follicles. *Fertil Steril.* 2004; 82:1648-1653.
 22. **Dolmans MM, Michaux N, Camboni A, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, Nottola SA, Donnez J.:** Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles. *Hum Reprod.* 2006; 21:413-420.
 23. **Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RM.:** Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod.* 1997 May;12(5):1032-6.
 24. **Zhang P, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Hreinsson J, Telfer EE, Hovatta O.:** In Vitro effect of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. *J Assist Reprod Genet.* 2004 Aug;21(8):301-6.
 25. **Hreinsson JG, Scott J, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh A, & Hovatta O.:** Growth Differentiation Factor-9 Promotes the Growth, Development, and Survival of Human Ovarian Follicles in Organ Culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(1):316-321.
 26. **Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN & Hovatta O.:** Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in Vitro. *Hum Reprod.* 2006; 21(9):2223-7.
 27. **West ER, Shea LD, Woodruff TK.:** Engineering the Follicle Microenvironment. *Semin Reprod Med.* 2007; 25:287-300.
 28. **West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD.:** Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in Vitro follicle development. *Biomaterials* 2007 Oct; 28(30): 4439-4448.
 29. **Amorim C, Van Langendonck A, David A, Dolmans MM, Donnez J.:** Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in Vitro culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod.* 2009; 24(1): 92-99.
 30. **Huntriss J, Picton HM.:** Epigenetic consequences of assisted reproduction and infertility on the human preimplantation embryo. *Hum Fertil.* 2008;11:85-94.
 31. **Kerjean A, Couvert P, Heams T, Chalas C, Poirier K, Chelly J, Jouanet P, Paldi A, Poirot C.:** In Vitro follicular growth affects oocyte imprinting establishment in mice. *Eur J Hum Genet.* 2003 Jul;11(7):493-6.
 32. **Anckaert E, Adriaenssens T, Romero S, Dremier S, Smits J.:** Unaltered imprinting establishment of key imprinted genes in mouse oocytes after in Vitro follicle culture under variable follicle-stimulating hormone exposure. *Int J Dev Biol.* 2009;53(4):541-8.
-

Normas de publicación

Se recomienda la lectura de las siguientes instrucciones de forma exhaustiva y seguirlas de manera estricta, con el fin de que la revisión de sus contribuciones, así como la publicación de las mismas sea lo más rápida posible. Los editores se reservan el derecho de rechazar un manuscrito en caso de no cumplir las normas aquí establecidas.

ÁREAS DE PUBLICACIÓN

La Revista Iberoamericana de Fertilidad considera para su publicación todos aquellos manuscritos en lengua castellana o inglesa (siempre y cuando la lengua nativa del primer autor sea inglés) que puedan ser adaptados a los apartados siguientes dentro del ámbito de la Medicina Reproductiva:

- 1.- Puestas al día:** Revisiones exhaustivas de aspectos puntuales y novedosos de la Medicina Reproductiva. La extensión de la revisión no deberá superar las diez páginas, sin contar la bibliografía, que deberá limitarse a los últimos diez años, con excepción de las citas históricas o relevantes.
- 2.- Trabajos originales:** Estudios de tipo clínico o experimental que aporten nuevos aspectos en el campo de la Medicina Reproductiva.
- 3.- Casos clínicos:** Se publicarán casos que por su rareza o interés, puedan aportar aspectos nuevos en el conocimiento de la Medicina Reproductiva. Su extensión se limitará a tres páginas, y la bibliografía tendrá un máximo de 20 citas.
- 4.- Cartas al Editor:** Comentarios críticos en relación a una publicación reciente hecha en La Revista Iberoamericana de Fertilidad. La carta deberá constar de un máximo de 400 palabras y podrá contener hasta 5 referencias bibliográficas.
- 5.- Imágenes en Medicina Reproductiva:** Fotografías de hallazgos médicos o quirúrgicos, microfotografías e imágenes de ultrasonidos. Se deberán acompañar de un breve comentario que no exceda las 150 palabras, no requiere referencias bibliográficas.

El ámbito de la revista incluye todos los aspectos fisiológicos y patológicos de la Medicina Reproductiva: andrología, bioética y legislación, cirugía, contracepción, embriología, endocrinología, esterilidad, infertilidad y técnicas de reproducción asistida, enfermedades de transmisión sexual, genética y menopausia.

En la revista constan secciones de actualidad y notas bibliográficas. Si se desea participar en las mismas se pueden remitir contribuciones a la Secretaría General.

REMISIÓN DE UN MANUSCRITO

Se remitirá original y 3 copias del texto íntegro del manuscrito y de la iconografía a la "Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana", Dr. Luis Alberto Quintero. Apartado de correos 87, 46110 - Godella - Valencia (España), **No utilizar el servicio de correo certificado**, y/o directamente a: revistafertilidad@yahoo.es, siendo esta la vía preferible de envío, para un manejo más rápido del proceso de evaluación y aceptación de su trabajo.

El manuscrito se mecanografiará o imprimirá a doble espacio, con márgenes de 2,5 cm a ambos lados, superior e inferior en cada página. Todas las páginas se enumerarán en el margen superior derecho (la página del título es la 1).

Todos los manuscritos deben acompañarse, para su publicación de una declaración firmada por parte de todos los autores, mostrando su acuerdo con el listado y con el orden de prioridad, así como la cesión de los derechos de autor.

Se seguirá el siguiente orden: página del título, resumen y palabras clave, texto, agradecimientos, bibliografía, tablas (cada una en una página distinta), figuras (cada una en una página distinta) y leyendas de tablas y figuras.

Para mayor agilidad, se podrá enviar junto con las copias en papel del manuscrito, una copia en CD-ROOM, editando el documento en Word® para Windows o Macintosh.

PREPARACIÓN DE MANUSCRITOS

Página del título: Constará de lo siguiente: a) el título del artículo en español y en inglés, que deberá ser conciso pero informativo, preferiblemente no mayor de 100 caracteres. Por favor, proporcione un título abreviado de no más de 50 caracteres; b) el nombre de cada autor/a y su centro de trabajo; c) el nombre del departamento e institución a los que el trabajo debe atribuirse, indicando su ciudad, código postal y país; d) nombre y dirección del autor responsable de la correspondencia sobre el manuscrito; e) apoyos recibidos para la realización del estudio en forma de becas, equipos, fármacos, etc.

Resumen: La segunda página de cada manuscrito debe contener el resumen, redactado como único párrafo, que no excederá de 300 palabras. En éste deberá constar: a) objetivos, b) diseño del estudio, c) ámbito donde se desarrolla el estudio, d) características

de la población estudiada, e) principales intervenciones realizadas, f) variables principales de valoración, g) resultados, y h) conclusiones. Se deberá evitar el uso de abreviaturas y referencias a otros trabajos. Todos los trabajos deberán disponer de un resumen en inglés, con las características antes mencionadas.

Palabras clave: Tras el resumen, los autores deberán especificar e identificar como tales, un máximo de 5 palabras clave. Se deberá utilizar los términos del “Medical Subject Headings (MeSH) del Index Medicus”; si no hubiera términos apropiados disponibles de la lista del MeSH para los recientemente incorporados en la literatura, se podrá utilizar términos o expresiones de uso conocido.

Ilustraciones: Las fotografías, figuras, esquemas y dibujos se titularán como FIGURAS. Las tablas figurarán en el texto como TABLAS. En ambos casos se numerarán correlativamente por orden de aparición con caracteres arábigos. Todas las ilustraciones y tablas deberán llevar referencia en el texto.

Las figuras en ningún caso se enviarán incluidas en el texto, cada una irá en una hoja independiente, con la correspondiente numeración y una flecha a lápiz que indique el margen superior. Los pies de figura deberán estar listados en hoja aparte bajo el título de “LEYENDAS DE FIGURAS”. De igual manera se procederá con las tablas, las cuales serán mecanografiadas, nunca fotografiadas y siempre en sentido horizontal.

Las fotografías deberán estar bien contrastadas y realizadas en papel brillante. El número de figura irá al dorso, a lápiz, junto con una flecha que indicará el borde superior.

Los dibujos de esquemas y gráficas deberán estar realizados en tipo “profesional”. No se admitirán trazos manuales o mecanografiados. Dado que muchas de estas gráficas deberán ser reducidas, se recomienda que el tamaño mínimo de las letras en ellas contenidas sea de 5 mm.

Se incluirán los permisos para reproducir material que haya sido anteriormente publicado o para hacer uso de figuras que pudieran servir para identificar a personas.

Agradecimientos: Estos deben aparecer al final del texto (no en nota a pie de página). Los agradecimientos personales deberán preceder a los dedicados a instituciones o agencias.

Referencias bibliográficas: Las referencias se numerarán de manera correlativa según el orden en el que aparecen por primera vez en el texto. Se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Deberán añadirse en hoja aparte y numeradas bajo el título de “REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS”.

El formato para la descripción de las citas bibliográficas estará basado en el utilizado por la “National Library of Medicine” (NML) de los Estados Unidos en el “Index Medicus”, según sugiere el Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (Grupo

de Vancouver) en sus “Requisitos de uniformidad para manuscritos presentados a revistas biomédicas”.

Se deberán escribir en abreviatura los títulos de las revistas según el estilo empleado en el “Index Medicus”, para lo cual se puede consultar la “List of Journals Indexed” que se publica anualmente como publicación específica y en el número correspondiente al mes de Enero del “Index Medicus”. El listado también se puede obtener a través de internet: <http://www.nlm.nih.gov>.

Las alusiones a trabajos admitidos para su publicación pero aún no publicados deberán aparecer como “En prensa”; los autores deberán obtener permiso escrito para citar estos trabajos así como tener constancia de la admisión para su publicación.

ASPECTOS ÉTICO-LEGALES

Los autores deben evitar cualquier transgresión ética legal sobre las normas de publicación científica.

El envío de un manuscrito para su publicación implica que el trabajo no ha sido publicado previamente ni que se encuentra en vías de publicarse por otro organismo de difusión.

Si se incluyen en el trabajo tablas, figuras, fotografías o más de 200 palabras en el texto, que previamente hayan sido publicadas, se deberá contar y remitir los documentos correspondientes de cesión de los derechos de autor y otros documentos que sean necesarios para su publicación.

Queda implícito que los autores al remitir un manuscrito, ceden los derechos de autor a la Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana.

COPIAS DE MANUSCRITOS

La revista enviará a los autores del manuscrito publicado, 10 separatas del trabajo, sin coste alguno. En caso de requerir más, se deberán solicitar a la Secretaría General de la Revista y llevarán cargo.

SELECCIÓN ESPECIAL DE MANUSCRITOS

El Comité Editorial designará anualmente a cuatro de sus miembros, que junto a un miembro de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Fertilidad seleccionará uno de los trabajos originales publicados, destacable por su calidad científica, que será premiado económicamente.

Las normas de publicación de la Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana, están basadas en las establecidas por el “Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas” (Grupo de Vancouver) en sus requisitos de uniformidad para manuscritos presentados a revistas biomédicas(1).

1.- International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirement for Manuscript Submitted to Biomedical Journal. N Engl J Med 1997; 336: 309-315.