

# **Acta Médica**

Grupo Ángeles

Volumen  
Volume **1**

Número  
Number **1**

Enero-Marzo  
January-March **2003**

*Artículo:*

## **Evaluación de la proporción de esteroides sexuales intrafoliculares y séricos con el grado de madurez ovular**

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Grupo Ángeles Servicios de Salud

**Otras secciones de este sitio:**

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

***Others sections in this web site:***

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



**Edigraphic.com**



# Evaluación de la proporción de esteroides sexuales intrafoliculares y séricos con el grado de madurez ovular

Alberto Kably Ambe,\* Julián Ruiz Anguas,\* Esperanza Carballo Mondragón,\* José Antonio Garzón Núñez,\* Samuel Karchmer K\*

## Resumen

**Objetivo:** Evaluar hormonalmente el microambiente folicular y su relación con la calidad y madurez del ovocito. **Tipo de estudio:** Prospectivo, observacional y analítico. **Material y métodos:** Se incluyeron 136 pacientes del programa de fertilización *in vitro*. Se obtuvo el líquido folicular durante la captura ovular, y se determinaron los niveles de estradiol intrafolicular por fluorescencia, la concentración de progesterona y testosterona por quimioluminiscencia. La calidad ovocitaria se valoró con base en la presencia del cuerpo polar, morfología del espacio perivitelino e inclusiones citoplasmáticas. El análisis estadístico se realizó con P de Pearson y t de Student con un intervalo de confianza de 95%. **Resultados:** El promedio de edad de las pacientes fue de  $33.8 \pm 5$  años. El número de ovocitos capturados en promedio fue de  $10.53 \pm 7.14$  por paciente. Los niveles foliculares de estradiol y progesterona no presentaron correlación estadística con la calidad y madurez ovocitaria. Por su parte los niveles de testosterona menores a 1,400 ng/mL presentaron una mayor cantidad de ovocitos maduros con calidad morfológica excelente. El índice estradiol/progesterona menor a 100 se asoció con mejor calidad ovocitaria (59.26% vs 35.71%). La relación estradiol/testosterona mayor a 900 se asoció con ovocitos maduros (77.8% vs 59.6%). No se observó relación entre los niveles hormonales foliculares y el porcentaje de fertilización. **Conclusiones:** Un microambiente hormonal intrafolicular es fundamental en el desarrollo ovocitario, niveles bajos en testosterona se relacionan con mejor calidad y madurez ovulares. La relación estradiol/progesterona menor a 100 se asocia con mejor calidad ovocitaria.

**Palabras clave:** Calidad ovocitaria, fertilización *in vitro*, estradiol, progesterona, testosterona.

## Summary

**Objective:** We sought to evaluate the follicular microenvironment and its relation with quality and type of ovocyte. **Type of study:** Prospective, observational, and analytical. **Material and methods:** One hundred thirty six patients from the *in vitro* Fertilization Program at the Hospital Angeles de las Lomas in Mexico City were included. We obtained follicular liquid from each patient during ovarian capture and determined intrafollicular estradiol levels by fluorescence, and progesterone and testosterone concentration by chemoluminescence. Oocyte quality was calculated based on presence of polar body, perivitelline space morphology, and cytoplasmatic inclusions. Statistical analysis was carried out with Pearson P and Student t tests with 95% confidence interval (95% CI). **Results:** Average patient age was  $33.8 \pm 0.5$  years. Number of captured oocytes captured was  $10.53 \pm 7.14$  per patient. Estradiol and progesterone follicular levels did not show statistical correlation with oocyte quality and maturity. Testosterone levels < 1,400 ng/mL presented a greater amount of mature oocytes with excellent morphologic quality. Estradiol/progesterone index < 100 was associated with better oocyte quality (59.26 vs 35.71%). Estradiol/testosterone relationship > 900 was associated with mature oocytes (77.8 vs 59.6%). No relation was observed between follicular hormone levels and percentage of fertilization. **Conclusions:** Intrafollicular hormonal environment is fundamental in ovocyte development; low testosterone levels are related with better quality and ovarian maturity. Estradiol/progesterone relationship < 100 is associated with better oocyte quality.

**Key words:** Oocyte quality, *in vitro* fertilization, estradiol, progesterone, testosterone.

## INTRODUCCIÓN

Pocos días antes del pico de la hormona luteinizante (LH) y la ovulación, el folículo De Graaf está formado de una capa externa de células de la teca con un aporte vascular importante, separado por una capa vascular de células de la granulosa. Alrededor del día de la ovulación existe una importante actividad angiogénica y las células germinales endoteliales crecen a partir de los capilares y vénulas de la

\* Unidad de Reproducción Asistida, Centro Especializado para la Atención de la Mujer. Hospital Ángeles de las Lomas.

Correspondencia:

Dr. Alberto Kably Ambe  
Vialidad de la Barranca s/n, Col. Valle de las Palmas  
C.P. 52763 Huixquilucan, Edo. de México  
Correo electrónico: cepam@infosel.net.mx

Aceptado: 03-12-2002.

teca, pasan a través de la lámina propia hacia la granulosa y establecen un sistema vascular con un flujo sanguíneo importante.<sup>1</sup> El líquido folicular constituye el microambiente que nutre al ovocito, y está constituido por un exudado de plasma producido por las células del folículo.

Como parte de la maduración del folículo, el volumen de líquido folicular, así como los niveles hormonales intrafoliculares aumentan, condicionando un microambiente que es fundamental para el crecimiento y la maduración del ovocito,<sup>2</sup> por lo que los niveles hormonales en líquido folicular de estradiol, progesterona y prolactina, así como de otras sustancias han sido postulados como marcadores potenciales de la calidad ovocitaria.<sup>2-5</sup>

Durante los ciclos de fertilización *in vitro* con transferencia de embriones (FIV-TE), la estimulación ovárica es fundamental para condicionar un desarrollo folicular múltiple; sin embargo, esto puede modificar el balance hormonal fisiológico y afectar la foliculogénesis, lo que se verá reflejado en la calidad de los ovocitos.<sup>6</sup>

Se ha observado que los niveles de estradiol y progesterona séricos se correlacionan con sus concentraciones en líquido folicular; sin embargo, no se ha visto que varíen significativamente durante el desarrollo folicular entre ciclos con o sin estimulación.<sup>7</sup>

Se ha demostrado que el desarrollo y la madurez de ovocitos se asocian de manera más evidente con la relación estrógenos/andrógenos que con los valores individuales de éstos.<sup>8</sup> Autores como Westergaard o Seibel<sup>9,10</sup> coinciden en que la relación estrógenos/testosterona en líquido folicular obtenido durante la fase folicular en mujeres con ciclos regulares parece ser uno de los parámetros más precisos para distinguir los folículos sanos de los atrésicos, ya que los primeros presentan una cantidad mayor de estrógenos.

Estudios realizados por Xia y cols.<sup>7</sup> dividieron los ovocitos en metafase II en cuatro categorías de acuerdo al tamaño del espacio perivitelino, el primer cuerpo polar y la presencia de inclusiones citoplasmáticas. La clasificación cuatro corresponde a los de mejor calidad, y al correlacionarlos con la proporción estradiol/testosterona, observaron que, cuando ésta es menor de 100, existe una mayor cantidad de ovocitos clase uno y dos (mala calidad), con tasas bajas de fertilización; por el contrario, cuando esta relación es mayor a 200, la presencia de ovocitos clase tres y cuatro aumenta. Al correlacionar niveles de estradiol/progesterona, se observó que cuando la proporción se encontraba entre 0 y 20, los ovocitos también eran de mala calidad con abundantes inclusiones intracitoplasmáticas, asociándose a tasas bajas de fertilización.

En otro estudio realizado por Paul y cols.,<sup>11</sup> al determinar niveles hormonales en líquido folicular en ciclos espontáneos e inducidos con citrato de clomifeno o FSH

recombinante, observaron que mayores niveles de estradiol folicular se asociaban con mejor calidad ovocitaria, ya que una relación androstenediona/estradiol entre 0.04 y 0.06 presentaba ovocitos en metafase I y II, mientras que los inmaduros con vesícula germinal, tenían una proporción de  $1.3 \pm 0.8$ , y los ovocitos en degeneración de  $9.4 \pm 5.3$ .

A principios de la década de los 90 se postuló el término de síndrome de folículo vacío, reportándose una incidencia de 2 a 7% aproximadamente, en un estudio realizado por Bognar y cols.<sup>12</sup> quienes observaron que los folículos en los que no se capturaron ovocitos presentaban una proporción progesterona/estradiol de  $0.88 \pm 1.03$  comparado con una relación de  $5.67 \pm 1.7$  en los folículos donde sí se obtuvieron ovocitos. Asimismo al comparar la proporción androstenediona/estradiol, ésta fue de  $0.45 \pm 0.27$  vs  $0.21 \pm 0.19$  respectivamente, lo cual nos indica que alteraciones en el microambiente folicular pueden transformar la maduración y desarrollo ovocitarios.

Por otra parte, Klein y cols.,<sup>13</sup> en un estudio realizado en mujeres entre 40 y 45 años al comparar niveles de estradiol, androstenediona y progesterona en líquido folicular contra pacientes jóvenes, observaron que no había diferencia significativa en cuanto a niveles hormonales foliculares, y que en ambos grupos los niveles de estradiol y progesterona eran elevados y los niveles de testosterona y androstenediona eran bajos, con una relación estrógenos/andrógenos alta, asociándose a folículos maduros. Los autores concluyeron que muy probablemente la función del folículo en relación a la producción hormonal en mujeres mayores de 40 años es normal o discretamente aumentada para compensar la deficiencia de los ovocitos.

Con base en lo anterior, se decidió realizar el presente estudio prospectivo para valorar indirectamente el microambiente folicular y establecer la relación que existe entre los niveles hormonales intrafoliculares, evaluando de manera indirecta la calidad y madurez ovocitarias.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 136 pacientes que ingresaron al programa de Fertilización *in vitro* del Centro Especializado para la Atención de la Mujer, con una edad promedio de  $33.8 \pm 5.0$  años. Previamente a su ingreso, se realizó a cada paciente protocolo de estudio que incluía: FSH, LH y estradiol en el día 2-4 del ciclo, progesterona y prolactina en el día 21-23 del ciclo, perfil tiroideo, química sanguínea, biometría hemática, tiempos de coagulación, HIV, antígeno de superficie para hepatitis B, VDRL, perfil Torch, cultivo cervicovaginal para *Chlamydia* y *Mycoplasma*, y valoración de cavidad uterina por histerosalpingografía o histerosonografía.

La supresión hipofisiaria se realizó con el protocolo largo de fase lútea iniciando el día 21 del ciclo previo con acetato de leuprolide 0.5 mg sc. (Relisser Serono Lab. México), y la estimulación ovárica se realizó con menotropinas (Pergonal Serono Lab. México) o FSH recombinante (Conal F Serono Lab. México), individualizándose la dosis de acuerdo a la edad y niveles hormonales basales en cada paciente (FSH, LH, estradiol). Se realizó monitoreo del esquema de estimulación con ultrasonografía endovaginal, utilizando transductor endocavitario de 4 Mhz (Aloka SSD-1100).

Una vez que se observaron 3 o más folículos mayores de 18 mm de diámetro y niveles de estradiol sérico de 200 pg/mL o más por folículo maduro, se aplicó hGC 10,000 sc (Profasi Serono Lab. México), y 36 horas después se programó la captura ovular, la cual se realizó por vía transvaginal con guía ultrasonográfica tras sedación de la paciente.

Las muestras de líquido folicular fueron obtenidas de folículos mayores de 18 mm en los que se encontró ovocito, y fueron almacenadas a -20°C.

Se realizaron determinaciones de estradiol en líquido a través de fluorescencia con equipo VIDAS (Vitek System Bio-Merieux), así como de progesterona y testosterona por medio de quimioluminiscencia con equipo ACS 180-SE (Bayer Co LTD).

La calidad ovocitaria se valoró con base en el cuerpo polar, espacio perivitelino, e inclusiones citoplasmáticas,<sup>7</sup> determinándose 4 categorías: Grado 4: óvulos que presentaron cuerpo polar y espacio perivitelino normales; Grado 3: cuerpo polar fragmentado con espacio perivitelino normal; Grado 2: cuerpo polar normal, pero espacio perivitelino alargado; Grado 1: óvulos con alteraciones tanto en el espacio perivitelino como en el cuerpo polar. La madurez ovocitaria se catalogó como "inmadura" cuando se encontraban en profase y metafase I, y "madura" cuando se observaban en metafase II.

El análisis estadístico se realizó con Prueba P de Pearson y con t de Student con un intervalo de confianza del 95%, utilizando software SPSS 10.0.

## RESULTADOS

La dosis de FSH utilizada fue de  $4,762.5 \pm 1,285.5$  UI por paciente por ciclo estimulado; el tiempo de estimulación fue de  $13.2 \pm 1.2$  días, y los niveles de estradiol preovulatorio fueron  $4,556.64 \pm 3,301.25$  pg/mL en promedio.

El número de ovocitos capturados fue en promedio  $10.53 \pm 7.14$  por paciente, de éstos, se encontraban en profase I  $2.9 \pm 2.37$ , en metafase I  $3.4 \pm 2.39$  y en metafase II  $6.19 \pm 5.32$  (Figura 1).

Al realizar las determinaciones hormonales en líquido folicular se encontraron niveles de estradiol de  $887,879.77 \pm 583,832.31$  pg/mL por folículo en promedio, progesterona de  $9,587.25 \pm 2,414.25$  ng/mL y de testosterona  $1,203.75 \pm 503.85$  ng/mL.

Al correlacionar los niveles de estradiol séricos con los niveles foliculares, se observó correlación estadística entre éstos con prueba de Pearson al 95% de confianza con  $p = 0.176$  (Figura 2).

Al tratar de correlacionar los niveles hormonales de estradiol en líquido folicular con la calidad o madurez ovocitarias, no se encontró ninguna asociación estadística, al igual que con los niveles de progesterona (Cuadros I y II). Sin embargo, en relación a la testosterona se observó que en las pacientes que tenían niveles por debajo de 1,400 ng/mL presentaban una mayor cantidad de ovocitos en

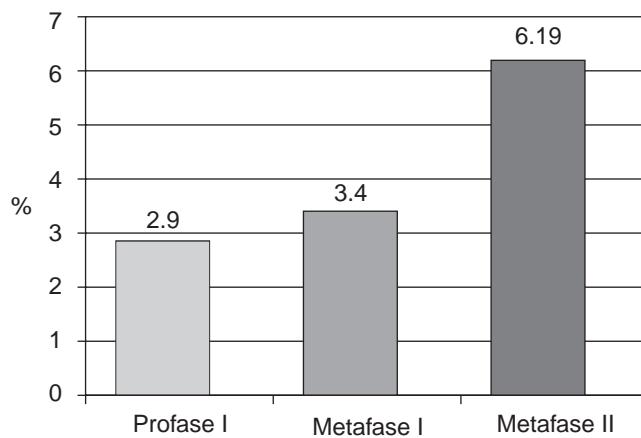


Figura 1. Ovocitos obtenidos según su madurez.

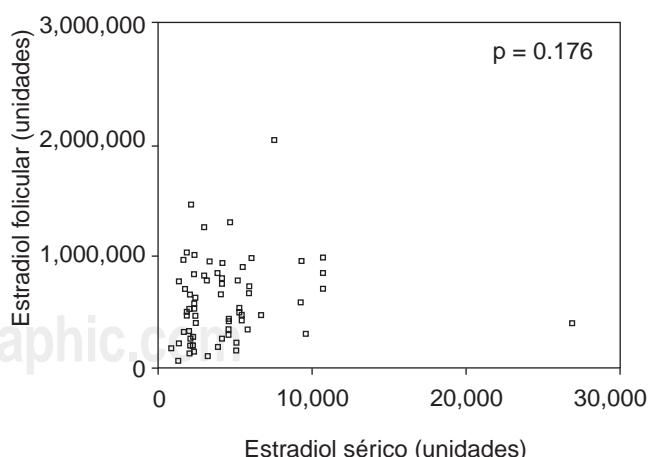


Figura 2. Correlación estradiol sérico y folicular.

**Cuadro I.** Correlación estradiol folicular con calidad y madurez ovocitarios.

Estradiol (pg/mL)	< 300,000	301,000 a 600,000	601,000 a 900,000	> 900,000
<b>Madurez ovocitaria</b>				
Profase I (%)	3.85	5.00	2.50	6.90
Metafase I (%)	23.08	32.50	32.00	17.24
Metafase II (%)	73.08	62.50	65.00	75.86
<b>Calidad ovocitaria</b>				
Grado 4 (%)	61.54	62.50	52.50	41.38
Grado 3 (%)	38.46	32.50	37.50	51.72
Grado 2 (%)	0.00	2.50	10.00	6.90
Grado 1 (%)	0.00	2.50	0.00	0.00

Sin significancia estadística

**Cuadro II.** Correlación progesterona folicular con calidad y madurez ovocitarias.

Progesterona (ng/mL)	< 5,000	5,001-10,000	10,001-15,000	>15,000
<b>Madurez ovocitaria</b>				
Profase I (%)	0.00	2.78	9.09	0.00
Metafase I (%)	14.29	33.33	27.27	29.17
Metafase II (%)	85.71	63.89	63.64	70.83
<b>Calidad ovocitaria</b>				
Grado 4 (%)	42.86	61.11	54.55	54.17
Grado 3 (%)	42.86	36.11	38.18	45.83
Grado 2 (%)	14.29 +	2.78	5.45	0.00
Grado 1 (%)	0.00	0.00	1.82	0.00

+ p &lt; 0.05 en relación a otros grupos.

**Cuadro III.** Correlación testosterona folicular con calidad y madurez ovocitaria.

Testosterona ng/mL	< 700	701 a 1,400	1,401 a 2,100	> 2,101
<b>Madurez ovocitaria</b>				
Profase I (%)	0.00+	5.75+	13.64	60.00
Metafase I (%)	29.41	26.44	86.36	10.00
Metafase II (%)	70.59+	67.82+	0.00	30.00
<b>Calidad ovocitaria</b>				
Grado 4 (%)	64.71+	58.62+	45.45	20.00
Grado 3 (%)	35.29	37.93	40.91	60.00
Grado 2 (%)	0.00	2.30	13.64	20.00
Grado 1 (%)	0.00	1.15	0.00	0.00

+ p &lt; 0.5 comparado con grupo 3 y 4

metafase II y con calidad excelente (Grado 4), con una diferencia estadísticamente significativa a un intervalo de confianza del 95% (*Cuadro III*).

Al establecer el índice estradiol/progesterona (E/P) en líquido folicular, se dividió a las pacientes en dos grupos: aquellas que presentaban una relación E/P menor de 100 y aquellas que presentaban un índice mayor de 100. Los resultados mostraron diferencias significativas importantes en relación a la calidad ovocitaria, ya que el porcentaje de ovocitos con buena calidad (Grado 4) fue del 59.26% comparado con 35.71% del grupo dos. Por el contrario, en el primer grupo, la cantidad de ovocitos de mala calidad (Grado 1) fue menor en comparación al segundo (2.78% vs 17.86%), ambos estadísticamente significativos a un intervalo de confianza del 95% (*Cuadro IV*).

Por otro lado, la relación estradiol/testosterona (E/T) mostró que, al dividir a las pacientes también en dos grupos, existían diferencias significativas en función de la madurez ovocitaria. Las pacientes que presentaban una relación E/T menor de 900 tuvieron mayor cantidad de ovocitos en profase I (17.4% vs 3.70%), mientras que la cantidad de ovocitos en metafase II disminuyó (59.6% vs 77.78%), siendo ambos resultados estadísticamente significativos a un intervalo de confianza del 95% (*Cuadro V*).

Al tratar de correlacionar niveles hormonales foliculares y porcentaje de fertilización ovocitarios no se observó asociación entre ellos.

## DISCUSIÓN

El desarrollo y maduración ovocitarios están influenciados por el microambiente hormonal presente durante la fase folicular del ciclo ovárico. En este estudio efectuado en pacientes a las cuales se realizó hiperestimulación ovárica controlada para ciclos de FIV-TE se observó que los niveles de estradiol en líquido folicular presentan una correlación directa con sus concentraciones séricas, datos que coinciden con lo reportado en la literatura por autores como Xia y cols.<sup>7</sup>

Al analizar los niveles de estradiol, testosterona y progesterona por separado no se logró establecer alguna correlación con la calidad o maduración ovocitarias, lo cual coincide con autores como Anderson en 1993,<sup>8</sup> quizás debido a que el desarrollo del óvulo no dependa exclusivamente de una sola hormona sino de la interacción que existe entre éstas.

En el presente estudio se observó que en las pacientes que presentaban una relación E/T menor, la cantidad de ovocitos inmaduros se incrementaba, y por el contrario la cantidad de ovocitos en metafase II era menor, hallazgo que coincide con estudios realizados por Fukuda y cols.,<sup>14</sup>

o Xia y cols.<sup>7</sup> Lo anterior orienta a deducir que si bien es importante la aromatización a nivel de células de la teca para la madurez ovocitaria, los niveles de estrógeno continúan siendo fundamentales, estos hallazgos también fueron reportados por Paul y cols, quienes encontraron en ovocitos maduros la presencia de mayores niveles de estradiol en líquido folicular, con una relación androstenediona/estradiol baja, a diferencia de ovocitos inmaduros o degenerados, en los cuales la relación era mayor.<sup>11</sup>

Por otro lado al tratar de analizar el valor pronóstico de la progesterona no se encontró que existiera alguna correlación con la calidad o madurez del ovocito, sin embargo al correlacionar el índice E/P se observó que en pacientes con índices menores de 100, la presencia de ovocitos clase cuatro (buena calidad) fue mayor y por el contrario en aquellas que presentaban un índice superior a 100 aumentaba la frecuencia de ovocitos de mala calidad, estos resultados coinciden con el estudio de Xia y

**Cuadro IV.** Correlación estradiol/progesterona con calidad y madurez ovocitarias.

Índice E/P	< 100	> 100
<b>Madurez ovocitaria</b>		
Profase I (%)	4.63	3.57
Metafase I (%)	27.78	21.43
Metafase II (%)	67.59	75
<b>Calidad ovocitaria</b>		
Grado 4 (%)	59.26*	35.71
Grado 3 (%)	37.96	46.43
Grado 2 (%)	2.78*	17.86
Grado 1 (%)	0.93	0

\* p < 0.5

**Cuadro V.** Correlación estradiol/testosterona con calidad y madurez ovocitarias.

Índice E/T	< 900	> 900
<b>Madurez ovocitaria</b>		
Profase I (%)	17.4*	3.70
Metafase I (%)	22.9	18.52
Metafase II (%)	59.6*	77.78
<b>Calidad ovocitaria</b>		
Grado 4 (%)	53.21	59.26
Grado 3 (%)	40.37	37.04
Grado 2 (%)	5.5	3.7
Grado 1 (%)	0.92	0

\* p < 0.5

cols.,<sup>7</sup> quienes reportan una mayor cantidad de ovocitos con inclusiones citoplasmáticas, que traducían mala calidad en folículos con relación E/P baja.

Bognar y cols.,<sup>12</sup> han reportado el "síndrome del folículo vacío" observando valores bajos en la relación estradiol/progesterona en estas pacientes, lo cual sugiere una alteración en el proceso de luteinización.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que el desarrollo y maduración ovocitarios no dependen exclusivamente de los niveles de estradiol intrafolicular, sino que debe de existir un balance adecuado y propicio entre las hormonas producidas por células de la teca y la granulosa, los niveles de testosterona intrafolicular al parecer juegan un papel importante en la maduración folicular, ya que se observó que entre menores niveles de testosterona la calidad y madurez ovocitarias eran mayores, lo que también traduce que índices E/T elevados se asocian con ovocitos maduros, mientras que el índice E/P bajo se correlaciona con ovocitos de buena calidad.

## REFERENCIAS

1. McClure NM, MacPherson AM, Abberton KM, Healy DL, Rogers PAW. Human follicular fluid maturity and endothelial cells. *Hum Reprod* 1993; 8: 1564-1569.
2. Tarlatzis BC, Pazaïtou K, Bontis J, Papadimas J, Lagos S, Sapanos E, Mantalenakis S. Growth hormone, estradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. *Hum Reprod* 1993; 8: 1612-1616.
3. Botero-Ruiz W, Laufer N, De Cherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes *in vitro*. *Fertil Steril* 1984; 41: 820-826.
4. Fishel SB, Edwards RG, Walters DE. Follicular steroids as prognosticators of successful fertilization of human oocytes *in vitro*. *J Endocrinol* 1983; 99: 335-339.
5. Laufer N, Botero-Ruiz W, De Cherney AH, Haseltine F, Polan ML, Behrman RH. Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human oocytes successfully fertilized *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 54: 430-435.
6. Andersen CY, Westergaard LG, Sinosich MJ, Bysok AG. Human pre-ovulatory follicular fluid: inhibin and free steroids related to optimal follicular maturation in ovarian stimulation regimes and possible function in ovulation. *Hum Reprod* 1992; 7: 765-769.
7. Xia P, Younglai EV. Relationship between steroid concentrations in ovarian follicular fluid and oocyte morphology in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *J Reprod Med Fertil* 2000; 118: 229-233.
8. Andersen CY. Characteristics of human follicular fluid associated with successfull conception after *in vitro* fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1227-1234.
9. Westergaard L, Christensen IJ, McNatty KP. Steroid levels in ovarian follicular fluid related to follicle size and health status during the normal menstrual cycle in women. *Hum Reprod* 1986; 1: 227-232.
10. Seibel MM, Smith D, Dlugi AM, Levesque L. Periovulatory follicular fluid hormone levels in spontaneous human cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 1073-1077.
11. Lin PC, Abdallah MA, Eblen AC, Nakajima ST. Serum and follicular fluid levels during ovulation induction. *Fertil Steril* 2002; 77: 635-637.
12. Bognar Z, Manfai Z. Estradiol, progesterone and androstenedione content of follicular fluids in "empty follicles". *Gynecol Endocrinol* 1993; 7: 19-22.
13. Klein NA, Battaglia DE, Miller PB, Branigan EF, Giudice LC, Soules MR. Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1946-1951.
14. Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY, Byskov AG. Healthy and atretic follicles: vaginosonographic detection and follicular fluid hormone profiles. *Hum Reprod* 1995; 10: 1633-1637.
15. McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanond R, Ryan KJ. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationship among the steroid levels in antral fluid, the population of granulose cells, and the status of the oocyte *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 49: 851-860.

