

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
***Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida***

**Creación de gametos y embriones
artificiales. Una perspectiva biológica,
ética y legal.**

Autor: Lara Gallego Acuña

Tutor: Esther Táboas Lima

Alcobendas, Septiembre 2023

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Objetivos	2
3. Métodos.....	3
4. Resultados	3
4.1. Embriogénesis y gametogénesis	3
4.2. Gametos artificiales	7
4.2.1. Diferenciación de células precursoras	7
4.2.2. Haploidización	16
4.2.3. Diferenciación de ESCs	19
4.2.4. Diferenciación de iPSCs.....	21
4.2.5. De iPSCs masculinas a ovocitos	24
4.3. Embriones artificiales	25
4.3.1. Partenogénesis	25
4.3.2. Obtención de embriones a partir de células totipotentes.....	26
4.3.3. Obtención de embriones mediante la agregación de células troncales	26
4.3.4. Clonación doble de espermatozoides	30
4.4. Cuestiones éticas y legales en la creación de gametos y embriones artificiales.....	31
5. Argumentación crítica.....	34
6. Conclusiones	34
Referencias	36

RESUMEN

La infertilidad ha sido clasificada como una enfermedad por parte de la OMS. Afecta al 17.5% de los adultos y a 1 de cada 6 parejas. Una de sus causas es la falta de gametos, para la cual la única alternativa es la donación de gametos o embriones. Otra parte de la población que también necesita recurrir a esto son las parejas homosexuales y las personas solteras. En las últimas décadas, se ha comenzado a investigar la creación de gametos y embriones artificiales para este grupo de pacientes y para investigación, ya que su uso conlleva menos dilemas éticos que el empleo de gametos y embriones “naturales”. Por ello, el objetivo del trabajo ha sido recopilar información acerca de las técnicas que se han ido utilizado en estos campos y su evolución a lo largo del tiempo, así como su utilidad, tasa de éxito y el marco ético y legal que los ampara. Esto ha permitido concluir que la maduración *in vitro* de células precursoras de gametos es la que tiene más recorrido, mientras que la investigación con ESCs e iPSCs es más reciente. En los últimos años, también se ha estudiado la creación de gametos de un sexo a partir de células de un individuo del sexo contrario y la creación de embriones con solo un tipo de gameto. Sin embargo, el principal obstáculo de todas estas técnicas es el establecimiento de una epigenética aberrante, lo que da lugar a una baja eficiencia. La historia de los embriones artificiales es más reciente, pero se ha llegado al comienzo de la organogénesis en ratones. Sin embargo, las leyes que regulan estas técnicas son difusas. Es necesario llegar a un consenso internacional para regular el uso de gametos y embriones artificiales, tanto en clínica como en investigación.

Palabras clave: embriones artificiales, ética, gametos artificiales, infertilidad, legislación.

ABREVIATURAS

MCI	Masa Celular Interna
TF	Trofectodermo
ZP	Zona Pelúcida
PGC	Célula Germinal Primordial
VG	Vesícula Germinal
MI	Metafase I
FSH	Hormona Foliculoestimulante
LH	Hormona Luteinizante
CP	Corpúsculo Polar
MII	Metafase II
ESC	Célula Troncal Embrionaria
TSC	Célula Troncal del Trofectodermo
XEN	Célula Troncal del Endodermo Primitivo
AMH	Hormona Antimulleriana
iPSC	Célula Troncal Pluripotente inducida
PGCLC	Célula Parecida a las Células Germinales Primordiales
hCG	Gonadotropina Coriónica Humana
ETX	Embrión artificial formado por agregación de ESCs, TSCs y XENs
iXEN	Célula Troncal del Endodermo Primitivo inducida
iETX	Embrión artificial inducido formado por agregación de ESCs, TSCs y XENs
iTSC	Célula Troncal del Trofectodermo inducida

1. Introducción

La infertilidad es una enfermedad caracterizada por la incapacidad de lograr un embarazo tras 12 o más meses de relaciones sexuales regulares sin protección. Según los últimos datos de la OMS, el 17.5% de los adultos y 1 de cada 6 parejas presenta problemas de fertilidad (1), pero cada año la cifra es mayor (2). Esta enfermedad puede tener diferentes causas, entre las que se encuentra una ausencia de gametos, que afecta al 0.63% de los hombres y al 1% de mujeres. Puede ser consecuencia de: azoospermia no obstructiva y tratamientos quimioterápicos en hombres y edad avanzada, síndrome de ovario poliquístico, insuficiencia ovárica prematura, menopausia, cáncer de ovario y quimioterapia en mujeres, entre otros (3)(4)(5).

La alternativa más comúnmente utilizada en las clínicas de fertilidad tras varios ciclos fallidos con gametos propios o por ausencia de ellos es el tratamiento con gametos donados (uno o los dos) y, menos comúnmente, el tratamiento con embriones donados, sobrantes de ciclos de otros pacientes (2)(3). Sin embargo, la donación en este ámbito no es una práctica regulada y legal en todos los países (4) y en aquellos donde la ley la ampara, sigue habiendo cierta reticencia por parte de los pacientes por miedo a que el futuro bebé desarrolle una enfermedad hereditaria, por desconfianza y desconocimiento del ambiente donde creció y vivió el y/o la donante, por los largos tiempos de espera hasta dar con un embrión compatible debido al escaso número de pacientes que cumplen los requisitos y deciden donar sus embriones sobrantes y, sobre todo, por el duelo genético, un proceso psicológico al que todas las parejas en tratamiento con gametos o embriones donados se enfrenta al toparse con la realidad nunca antes considerada de ser incapaces de tener hijos con su propia genética (2).

Otro grupo de pacientes que se ve en la necesidad de utilizar al menos un gameto donado en sus ciclos de reproducción asistida son las parejas homosexuales y las personas solteras (3)(2). En el caso de dos mujeres homosexuales, puede ser solo una de ellas la que participe en el proceso, sometiéndose a una inseminación artificial o fecundación *in vitro* con la muestra de un donante de semen, al igual que en el caso de una mujer soltera. Si se desea que ambas participen, existe una alternativa: el método ROPA, en el que se fecundan los óvulos de una de las mujeres con el semen donado y se transfiere el embrión obtenido al útero de la otra mujer. Sin embargo, a pesar de existir evidencias de una influencia epigenética sobre el embrión por parte de la mujer gestante, con este método solo una de ellas transmite su genética a la descendencia.

Por otro lado, los casos de parejas formadas por dos hombres y de hombres solteros son más complejos, pues se hace imprescindible la ovodonación y la gestación subrogada, esta última no regulada en muchos países y fuente de bastantes controversias. Además, la única forma de

que ambos miembros de la pareja contribuyan a la genética de la descendencia es que se transfieran a la mujer gestante dos embriones obtenidos por la fecundación de dos óvulos: uno con la muestra seminal de uno de los padres y otro con la muestra del otro. Por lo tanto, no existe una forma de que ambos contribuyan a la genética de un mismo embrión.

Es bajo este pretexto que surge la idea de crear gametos y embriones artificiales *in vitro* con el fin de beneficiar a ciertos pacientes de reproducción asistida. Los gametos artificiales se obtienen a partir de células precursoras de espermatozoides y óvulos, de células germinales primordiales y a partir de células somáticas o troncales de los propios pacientes, que se diferencian *in vitro* a células de la línea germinal. Los embriones artificiales, por su parte, se crean, principalmente, a partir de células embrionarias. Por lo tanto, estas técnicas son una alternativa a la donación de gametos y embriones que permitiría a estos pacientes tener descendencia genéticamente relacionada (2)(3)(4).

Por otro lado, la investigación con embriones humanos se encuentra limitada por el marco legal de varios países en los que no se permite crearlos sin fines reproductivos ni mantenerlos en cultivo durante más de 14 días para estudiar fases más tardías de su desarrollo, que son más difíciles de investigar *in vivo* debido al difícil acceso a la cavidad uterina y a muestras de la misma, sin provocar cambios en el útero que deriven en un aborto espontáneo o puedan afectar al correcto desarrollo del embrión (6). De igual manera, existen restricciones éticas y legales a la hora de investigar con gametos humanos, pero el mayor impedimento es el limitado acceso a ellos. Como alternativa, se ha investigado con gametos y embriones de modelos animales, pero siempre hay diferencias especie-específicas que impiden la completa extrapolación de los resultados a los humanos (2).

Por ello, otra aplicación de interés de los gametos y embriones artificiales es su uso en investigación. Existen grupos interesados en crear espermatozoides, óvulos y embriones humanos *in vitro* lo más parecidos posible a los “naturales” para entender su funcionamiento. De conseguirlo, se contaría con mejores modelos con los que poder estudiar la gametogénesis, la embriogénesis y las causas de infertilidad. Además, permitirían probar y desarrollar tratamientos para esta enfermedad, así como nuevos métodos anticonceptivos (2)(3)(4).

2. Objetivos

El objetivo principal es realizar una revisión de las técnicas existentes en la actualidad para crear gametos y embriones artificiales *in vitro* y resumir su evolución y éxito en el tiempo. Los objetivos secundarios son abordar los usos y utilidad de dichas técnicas y discutir los problemas éticos y legales que pueden interferir en su aplicación.

3. Métodos

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de dos meses de duración, aproximadamente, acerca de las técnicas empleadas para obtener gametos y embriones artificiales *in vitro* a lo largo del tiempo, los dilemas éticos que despiertan y las leyes que las amparan o prohíben en distintos territorios. Para ello, se utilizaron los buscadores Google Académico, Science Direct y PubMed del NCBI y palabras clave como: gametos artificiales, embriones artificiales, células precursoras, haploidización, ESCs, iPSCs y ética y regulación legal de los gametos y embriones artificiales. Después, se cribaron y seleccionaron los mejores artículos, basándose en el factor de impacto de la revista y en el año de publicación, dando mayor relevancia a los publicados en los últimos cinco años. El gestor bibliográfico utilizado fue Mendeley.

A continuación, se redactó el TFM durante tres meses, aproximadamente. El *software* empleado fue Microsoft Word, de Office 365, y la plataforma *online* de Miro 2023.

4. Resultados

4.1. Embriogénesis y gametogénesis

Tras producirse una correcta fecundación, los dos gametos haploides, espermatozoide y óvulo, se fusionan, dando lugar a una célula diploide, denominada **cigoto**. Esta comienza a dividirse al día siguiente a razón de $2n$ células por día. En el primer día posfecundación, hay 2 células y esta estructura es ya considerada un **embrión**. Al segundo día, hay 4 células y al tercer día, 8.

Un embrión que se desarrolla bien comienza a compactarse en el cuarto día (estadio de **mórula**), cuando cuenta con 16-32 células. Al quinto o sexto día, debería encontrarse en estadio de **blastocisto**, caracterizado por presentar más de 100 células divididas en dos grupos bien diferenciados: la **masa celular interna (MCI)** (Tabla1), localizada en una cavidad, y, rodeándola y delimitando esta cavidad, el **trofotodermo (TF)** (Tabla 1), que proliferará más adelante, dando lugar a la placenta (Figura 1). Para que las células de un embrión se diferencien en estos dos tipos, ocurren cambios epigenéticos que afectan a su expresión génica. De la misma forma, las células de la MCI, que hasta el quinto día son totipotentes (dan lugar a cualquier tipo celular), se diferencian a continuación en dos capas pluripotentes, **epiblasto** e **hipoblasto**. Más adelante, el primero dará lugar al feto y el segundo, al saco vitelino.

Hasta este momento, el embrión sigue rodeado de la zona pelúcida (ZP) del ovocito a partir del cual se originó. Entre el sexto y séptimo día de desarrollo, se produce el fenómeno conocido como *hatching* o eclosión, en el que el embrión rompe la ZP y sale de ella para que las células del TF puedan entrar en contacto con el endometrio y se produzca la implantación.

En la tercera semana de gestación, el embrión se encuentra en estadio de **gástrula**. Es entonces, cuando las células del epiblasto se diferencian, dando lugar a los tres linajes celulares: **ectodermo**, **mesodermo** y **endodermo** (Figura 1) (Tabla 1). Cada uno de ellos está formado por células multipotentes, resultado de nuevos cambios en la expresión génica regulados por epigenética. Posteriormente, tras más diferenciación celular, tiene lugar **la organogénesis**.

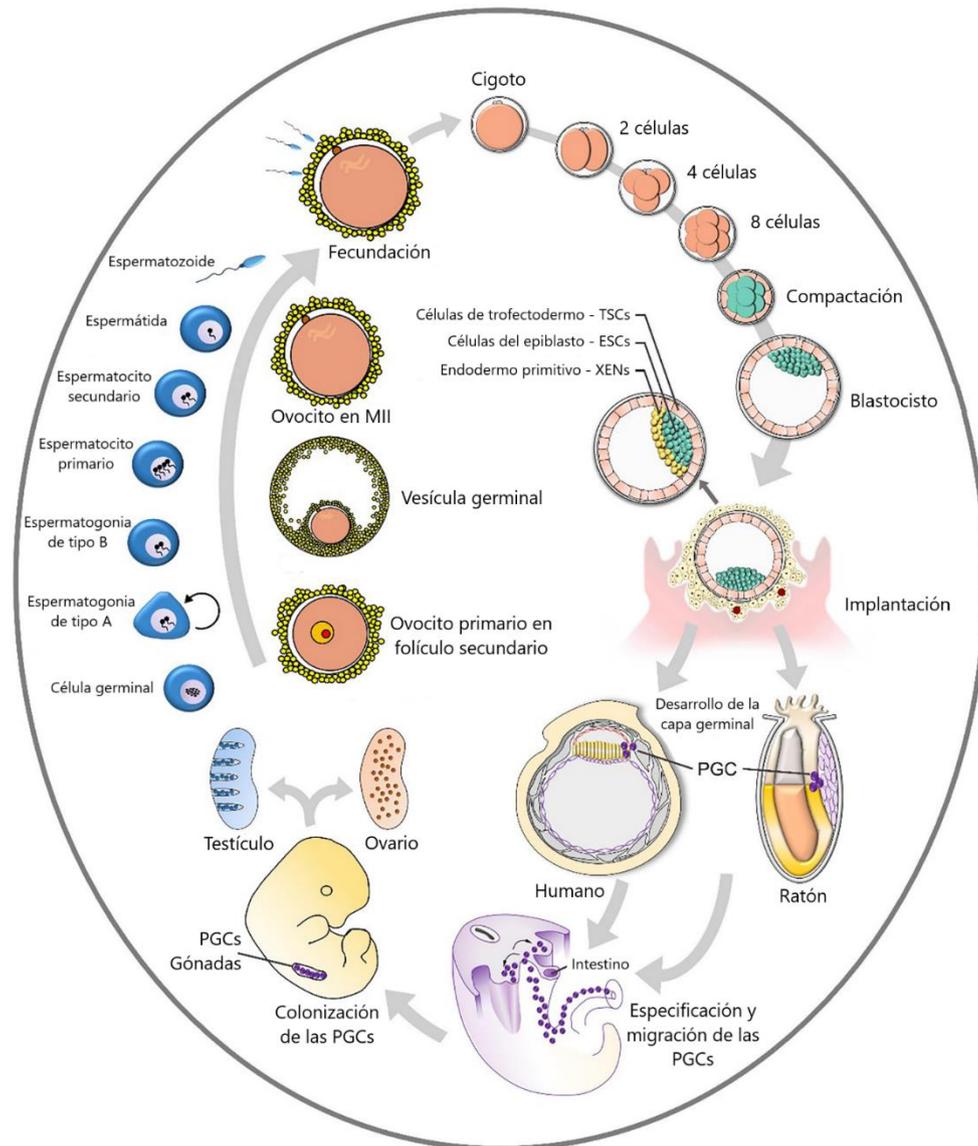


Figura 1. Etapas de la gametogénesis masculina y femenina (izquierda) y de la embriogénesis (derecha), así como su interrelación. Se indican también los tipos celulares que se pueden encontrar en cada una (adaptado de 4).

Los gametos se forman a partir de las **células germinales primordiales (PGCs)** (Tabla 1). Estas, dependiendo de la dotación cromosómica sexual del individuo (XX o XY), darán lugar a **ovogonias** o **espermatogonias** (Tabla 1), las células troncales precursoras de los ovocitos y los espermatozoides, respectivamente. Las **células precursoras de PGCs** se forman a partir del mesodermo (3) como respuesta a la señalización de las proteínas BMP2, BMP4 y BMP8b y se caracterizan por expresar BLIMP1, BLIMP4, *FRAGILIS*, *STELLA*, la fosfatasa alcalina y genes marcadores de pluripotencia, como *OCT4* y *NANOG*. Cuando el embrión se encuentra en

estadio de gástrula, tiene lugar un proceso de migración celular de estas precursoras de PGCs hasta el alantoides, al que llegan en la tercera semana de gestación. De ahí se dirigen a las gónadas primitivas en la quinta semana y llegan a las crestas genitales en la sexta, momento en el cual la gónada sigue indiferenciada (Figura 1). Durante esta migración, ocurre una remodelación de las histonas y una reprogramación epigenética caracterizada por la metilación del ADN (lo que implica inactivación génica) con el objetivo de borrar la impronta genómica de los padres. En este momento ya se denominan **PGCs** (2)(3)(7).

Una vez llegan a las crestas genitales, comienza la determinación sexual del feto. Las gónadas se desarrollan como testículos u ovarios dependiendo de la existencia o ausencia de un cromosoma Y, pues este contiene el gen *SRY*, que induce los cambios morfológicos necesarios para que se desarrollen los testículos. En su ausencia, la gónada indiferenciada sigue su desarrollo hasta formar los ovarios (Figura 1) (7). En este punto, embebidas en las gónadas, se encuentran las PGCs, que se también se someten a nuevos cambios epigenéticos para aumentar su diferenciación, dando lugar a **gonocitos** (Tabla 1).

Si se trata de un feto masculino, habrá expresión del gen *SRY*, lo que induce al gen *SOX9*. Así, los **gonocitos** sufren una remetilación del ADN para establecer una impronta genómica paterna y silenciar transposones y algunos comienzan a diferenciarse a células de Sertoli, las encargadas de nutrir a las espermatogonias. Los gonocitos proliferan en la gónada en la fase fetal a partir del tercer mes de gestación y continúan proliferando en menor medida incluso hasta cuatro meses después del nacimiento para, a continuación, migrar hasta la base de los túbulos seminíferos. Allí, se diferencian a **espermatogonias de tipo A**, que tienen la función de dividirse para mantener un *stock* y diferenciarse a **espermatogonias de tipo B**, que, igualmente, se renuevan y se diferencian a **espermaticitos primarios** (Figura 1). Es decir, las espermatogonias son células troncales adultas con 23 pares de cromosomas y una copia de material genético cada uno ($2N/2C$) (Tabla 1) (2)(7).

Durante la infancia temprana, coexiste la población de gonocitos con la de espermatogonias. Posteriormente, quedan las espermatogonias como únicas células troncales de los túbulos seminíferos, que darán lugar a los gametos masculinos en la etapa adulta, pues los espermaticitos primarios, que son diploides, comienzan la meiosis en la pubertad. Así, al terminar la meiosis I, se forman los **espermaticitos secundarios** ($1N/2C$). Al terminar la meiosis II, se denominan **espermátidas** ($1N/1C$) (Figura 1). En este punto, se finaliza también el proceso denominado **espermatogénesis o espermaticitogénesis**, que tiene lugar en los túbulos seminíferos. El resultado son cuatro células redondas por cada espermatogonia diferenciada, que se someten a un remodelado morfológico en el epidídimo, denominado

espermiogénesis o espermiogénesis, en el que se condensa el material genético, se forma el acrosoma y el flagelo y se elimina contenido citoplasmático, adquiriendo, así, las cuatro células la forma característica y funcionalidad de **espermatozoide** (Figura 1) (7).

En el caso de un feto femenino, en ausencia de expresión de gen *SRY*, los gonocitos dan lugar a **ovogonias**, que establecen una impronta materna y proliferan y se diferencian a **ovocitos** en la etapa fetal (Tabla 1). Para ello, aumentan su tamaño y desarrollan la zona pelúcida. Después, entran en meiosis y se quedan parados en la profase I más o menos en el momento del nacimiento y hasta la pubertad. Este es el estadio de **vesícula germinal (VG)** (Figura 1), cuyo mantenimiento es posible gracias a señales intra y extracelulares: AMPc producido por el ovocito y GMPc producido por las células somáticas que lo rodean y que es transferido al citoplasma del ovocito (2)(8).

Estas estructuras formadas por un ovocito y células somáticas alrededor de él (células de la granulosa) se denominan **folículos primordiales** y se forman a los tres meses de gestación. Un bebé nace con 1-2 millones de folículos primordiales. Con el paso de los años, se atresian, de manera que, cuando llega la pubertad, se cuenta con solamente 500.000. Es a partir de este momento cuando se comienza a reclutar un número de estos folículos cada mes para que crezcan y progrese la meiosis de los ovocitos contenidos en ellos desde la profase I hasta la metafase I (**ovocito primario o MI**) (Figura 1), como resultado de la síntesis de la hormona luteinizante (LH) por parte de la hipófisis, que llega a los ovarios y provoca la disminución de la secreción de GMPc en las células de la granulosa y la degradación del AMPc producido por los ovocitos. La reducción de la concentración de AMPc provoca la activación de MPF, un factor que induce la maduración ovocitaria y permite que prosiga la meiosis. Cabe destacar que, a pesar de encontrarse en profase I desde la etapa fetal, la meiosis se reinicia en la pubertad, por lo que el material genético no se duplica hasta entonces (2N/4C) (2)(8).

En la primera mitad del ciclo menstrual, estos folículos crecen en respuesta a la hormona foliculoestimulante (FSH), hasta llegar a un punto, denominado dominancia, en el que solo uno consigue seguir evolucionando, mientras el resto se atresia. Así, el ovocito contenido en el interior del folículo dominante madura hasta finalizar la meiosis I, gracias a la LH. La consecuencia es la extrusión del primer corpúsculo polar (CP) y la segregación de los cromosomas homólogos, de manera que ambos, ovocito y CP, cuentan en este punto con la mitad de la dotación cromosómica (son haploides), pero todavía tienen dos copias del material genético (1N/2C). Al ovocito en este momento se le conoce como **ovocito secundario**, en arresto en metafase II (**MII**) (Figura 1). Es entonces, en la mitad de ciclo menstrual, cuando sale hacia la trompa de Falopio, listo para ser fecundado (2)(8).

Si un espermatozoide fecunda un ovocito secundario, la meiosis del ovocito termina, extruyéndose el segundo corpúsculo polar y segregándose las cromátidas hermanas (1N/1C). Al fusionarse los citoplasmas de ambos gametos, se forma el **cigoto** (Figura 1), que cuenta con 23 pares de cromosomas y una copia de material genético cada uno (2N/2C) (8).

Tabla 1. Definición de los principales tipos celulares que se pueden derivar a gametos y embriones artificiales.

ESCs	Células pluripotentes de la MCI del blastocisto. Dan lugar al feto.
TSCs	Células pluripotentes del TF del blastocisto. Son esenciales para la implantación del embrión y dan lugar a la placenta.
XENs	Células multipotentes del endodermo primitivo del embrión en estadio de gástrula.
PGCs	Células germinales primordiales derivadas del mesodermo, precursoras de los gametos masculinos y femeninos. Se diferencian a gonocitos.
Gonocitos	Células precursoras de los gametos masculinos y femeninos en la gónada fetal. Su diferenciación depende de la existencia o ausencia del gen <i>SRY</i> . Desaparecen casi por completo unos meses después del nacimiento.
Espermatogonias	Células troncales adultas precursoras de espermatozoides, formadas a partir de gonocitos en presencia del gen <i>SRY</i> .
Ovogonias	Células troncales adultas precursoras de óvulos, formadas a partir de gonocitos en ausencia del gen <i>SRY</i> .

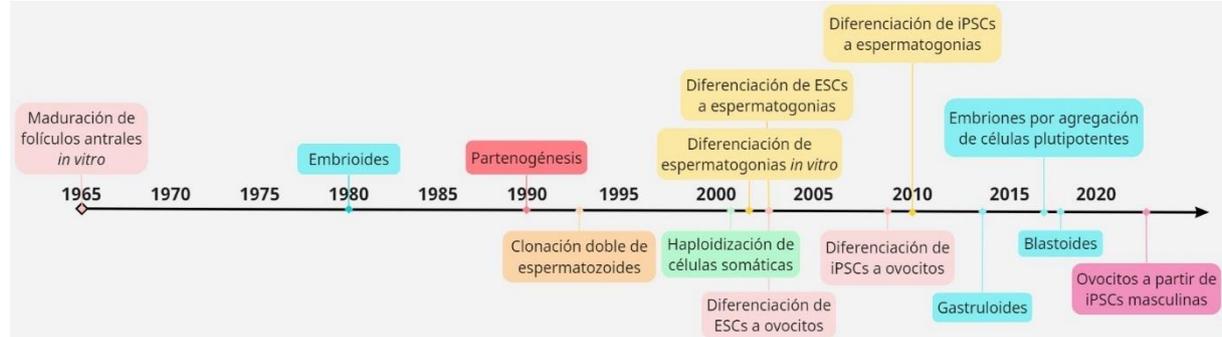


Figura 2. Línea del tiempo que muestra las fechas en las que se comenzó a utilizar cada una de las técnicas comentadas en este trabajo (elaboración propia en Miro).

Siguiendo la base aquí planteada (ver Tabla 1), en los apartados siguientes, se abordan las técnicas que han sido utilizadas para crear gametos y embriones *in vitro* a lo largo del tiempo y su evolución hasta la actualidad, cuyos hitos más importantes se resumen en la Figura 2.

4.2. Gametos artificiales

4.2.1. Diferenciación de células precursoras

El primer paso en la manipulación de cualquier tipo celular *in vitro* es averiguar las condiciones necesarias para que pueda sobrevivir en el laboratorio, en especial durante periodos largos de tiempo que permitan la experimentación y/o la obtención de otros tipos celulares. Es a partir de entonces cuando se puede empezar a jugar con los componentes del medio y la expresión genética hasta dar con los factores necesarios para inducir su proliferación y/o diferenciación.

Las PGCs fueron observadas por primera vez en gástrulas de ratón en 1990 formando clústeres de células productoras de fosfatasa alcalina (2). Fue en 1992 cuando se consiguieron cultivar *in*

in vitro por primera vez añadiendo bFGF y LIF al cultivo de estas células sobre una monocapa, consiguiéndose 20 pases celulares. Sin embargo, hasta 2008 no se comenzaron a dilucidar algunos de los mecanismos que tienen lugar en la diferenciación celular de las PGCs para poder recrearla *in vitro*. Se descubrió que expresan SSEA1, además de VASA, OCT4, NANOG, AP2 γ , STELLA y FRAGILIS, lo que constituyó una forma de identificarlas. Estudios realizados en la mosca de la fruta demostraron que la vía de JAK2/STAT5 estaría activa en la migración celular y adhesión de las PGCs y en su renovación celular. También se identificaron algunos genes con expresión activa en esta fase, como *C-KIT*, *NANOS3*, *SOX2* y *NANOG*, y durante la colonización de las gónadas, como *DDX4* y *DAZL*. Más adelante, en 2015, se descubrió que *SOX17* es esencial para la diferenciación de las PGCs a la línea germinal. *BLIMP1*, activado por *BMP4* a través de la vía de Wnt, refuerza su acción reprimiendo la expresión de genes que determinan la diferenciación a células del endodermo y del mesodermo. *BMP4* también activa a los factores *BLIMP14* y *TFAP2C* e inhibe a *OTX2*. Esto parece ser imprescindible para la producción de células de la línea germinal (2)(7)(9).

En cuanto a los gonocitos, en 1995 ya se sabía que la responsable de inducir su diferenciación es la hormona antimulleriana (AMH), pero fue a partir de 2008 cuando se comenzaron a dilucidar algunos de los mecanismos moleculares que rigen la diferenciación de este tipo celular. Aunque hoy en día todavía no se conocen con exactitud, se ha comprobado que el **ácido retinoico** (un derivado de la vitamina A y la única molécula conocida que induce la diferenciación celular a la línea germinal) activa una cascada de señalización que provoca la expresión del gen *STRA8*. La proteína que codifica induce la expresión de otros genes todavía desconocidos y, como consecuencia, la célula entra en meiosis. **STRA8** y **KIT**, otra proteína sintetizada en esta fase, se utilizan como marcadores de diferenciación celular (Figura 3) (7).

Se ha comprobado que la deficiencia en vitamina A provoca infertilidad en ratones y que, si se le administra esta vitamina a ratones deficientes, se reestablece la espermatogénesis, hecho que corrobora los anteriores hallazgos. Sin embargo, en general, existe bastante incertidumbre respecto a los detalles de las rutas de señalización celular activas durante la diferenciación de gonocitos. Se cree que las rutas de JAK2/STAT5 y las quinasas de la familia SRC podrían participar en este proceso y que la activación de la ruta de NOTCH en las células de Sertoli permitiría mantener el periodo de quiescencia de las células precursoras de la línea germinal masculina en la etapa fetal (Figura 3). También se han identificado algunas enzimas del sistema ubiquitina-proteasoma que parecen estar involucradas en la diferenciación celular a la línea germinal masculina: ligasa E3 RNF149 y ligasa E3 Huwe1 (7).

Debido al parecido en morfología entre gonocitos y espermatogonias, se han identificado algunos genes y factores de transcripción con expresión activa en gonocitos: *NUP153*, *SAFB2*, *OCT4*, *NANOG* y *AP2γ* y algunos miARNs que se expresan diferencialmente en cada tipo celular: miR-293, miR-291a-5p, miR290-5p y miR-294 en gonocitos (Figura 3) y miR-126, miR-743a y miR463 en espermatogonias. Además, a pesar de haberse encontrado expresión de la proteína LIN28A en ambos, su localización celular y, probablemente, su función, es distinta: se encuentra en el núcleo y el citosol de gonocitos y en el citosol de espermatogonias (7). Estos hallazgos facilitan la tarea de distinguir ambos tipos celulares.

Algunos de los anteriores miARNs expresados en gonocitos también se expresan en células troncales embrionarias para mantener su pluripotencia. Dos de las rutas de señalización en las que están involucrados son PTEN y Wnt/ β -catenina, cuya diana común es la Ciclina D1, que promueve la entrada en la fase S del ciclo celular, aunque los detalles todavía no se conocen. También se desconocen los mecanismos por los cuales “se decide” si un gonocito va a seguir proliferando o se va a diferenciar (7).

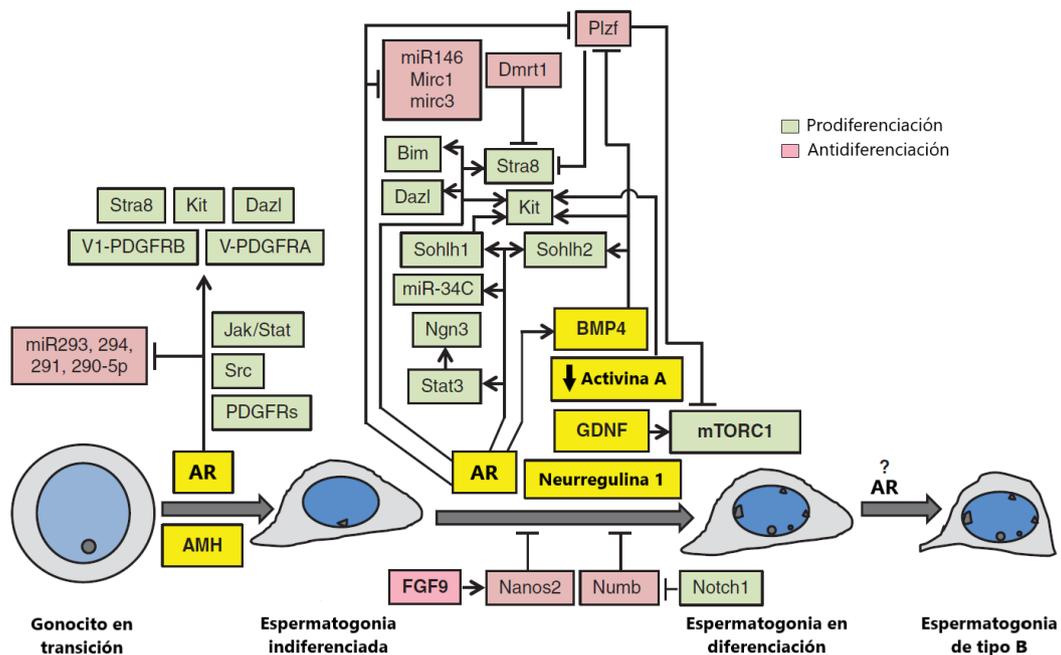


Figura 3. Resumen de las interacciones de las rutas de señalización celular conocidas que rigen la diferenciación de gonocitos y espermatogonias. AMH = hormona antimulleriana y AR = ácido retinoico (adaptado de 7).

Otra manera de distinguir espermatogonias de gonocitos es comprobar si existe expresión de la glicoproteína de superficie **THY1 (CD90)** y algunos genes involucrados en la renovación celular característicos de las espermatogonias, como los que codifican para los receptores *GFRα1* y *RET* y las proteínas *OCT4*, *PLZF*, *LIN28A*, *BCL6B*, *NGN3*, *ID4*, *CDH1*, *UTF1* y *SALL4* (7). Así, se pueden aislar del resto de células del testículo para realizar ensayos *in vitro*.

Se han descubierto algunos mecanismos que rigen la proliferación continuada de las espermatogonias, como micro ARNs responsables de estimularla a la vez que inhiben la apoptosis celular: miR-1908-3p, miR-663a, miR-31-5p y miR-122-5p, y algunos genes responsables de la formación de espermatogonias *in vivo*: *PAK1* y *FGF5* (9). Sin embargo, el perfil de expresión génica de las espermatogonias en fase de diferenciación celular todavía no está muy caracterizado, lo que dificulta su reproducción en el laboratorio y, por tanto, la obtención de espermatozoides a partir de ellas *in vitro*. Al igual que en la diferenciación de gonocitos, se conoce que el **ácido retinoico** juega un papel importante en este proceso, estimulando la síntesis de **STRA8** y **KIT** y, además, **SOHLH1** y **SOHLH2**, aunque los detalles son todavía difusos. Parece que la ruta de STAT3 y los factores de transcripción **NGN3** y **BMP4** podrían estar involucrados en este proceso, al igual que la inhibición de: 1) el marcador de pluripotencia **PLZF** por **BMP4** y el **ácido retinoico** y 2) la **activina A** por la **folistatina** y las **inhibinas**. También hay un par de miARN identificados que parecen tener un papel relevante: miR-21 en la renovación celular de las espermatogonias y miR-34c en su diferenciación celular, al inhibir la expresión de NANOS2 y aumentar la de STRA8. Al contrario, la acción de otros miARNs es inhibida por el ácido retinoico en la diferenciación celular de las espermatogonias para mitigar su efecto negativo sobre STRA8, KIT, BIM y STAT3 (Figuras 3 y 4) (7).

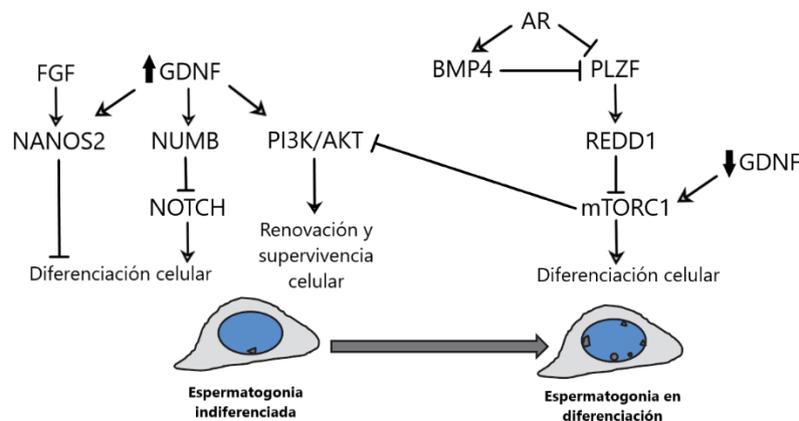


Figura 4. Hipótesis sobre las rutas moleculares responsables de la “toma de decisión” de una espermatogonia de seguir proliferando o entrar en fase de diferenciación celular. AR = ácido retinoico (elaboración propia).

Al contrario que en el caso de los gonocitos, sí hay un factor conocido que podría ser uno de los responsables de “la toma de decisión” de una espermatogonia de dividirse para mantener el *stock* o de diferenciarse: una alta expresión de **GDNF** lleva a la renovación celular y una baja expresión, a la diferenciación. Se cree que las rutas activadas por PLZF y GDNF podrían confluir en la vía mTORC1, que induciría la diferenciación y reprimiría la renovación celular. Así, en una espermatogonia en diferenciación, PLZF se encuentra inhibido por el ácido retinoico y BMP4, como se mencionó antes. Por lo tanto, mTORC1 está activo, induciendo la diferenciación celular e inhibiendo la vía AKT. La baja concentración de GDNF no es suficiente

para activar AKT y favorece la acción de mTORC1. Al contrario, una espermatogonia en fase de proliferación no está influenciada por el ácido retinoico. Entonces, PLZF está activo inhibiendo mTORC1, de manera que no puede inducir la diferenciación celular ni inhibir AKT, que podría ser una de las rutas responsables de activar la renovación celular (Figura 4) (7).

Sin embargo, hay autores que afirman que se trata de un proceso aleatorio. Que una espermatogonia siga proliferando o entre en diferenciación no depende de su ambiente (7).

Aun sin entender del todo los mecanismos moleculares que rigen la diferenciación de estas células precursoras de la línea germinal, a principios de los 2000 se comenzó a dar grandes pasos en el establecimiento de unas condiciones de cultivo *in vitro* de espermatogonias.

En 2002, Feng y colaboradores obtuvieron una línea inmortal de espermatogonias de tipo A sobreexpresando TERT, el componente catalítico de la telomerasa (enzima activa en células troncales, cuya función es mantener la longitud del ADN en cada división). Durante la diferenciación celular, la actividad de la telomerasa se pierde progresivamente. Estas células seguían manteniendo la morfología propia de las espermatogonias y expresaban sus marcadores C-KIT, DAZL y OCT-4. También se averiguó que añadiendo SCF se inducía su diferenciación y entrada en meiosis, dando lugar a espermátidas. Esta proteína es esencial para la producción de células de la línea germinal masculina y para el mantenimiento de la fertilidad (9).

En 2004, Kubota y colaboradores consiguieron mantener espermatogonias en cultivo en monocapa durante 6 meses. Su protocolo se basó en un cultivo libre de suero suplementado con GDNF, bFGF y GFRA1, que inducía la proliferación celular a largo plazo en un ratio comparable al de este proceso *in vivo*. Además, descubrieron que, al ser transferidas a los túbulos seminíferos de ratones infértiles, estos se volvían fértiles, por lo que las espermatogonias obtenidas *in vitro* debían de ser capaces de seguir proliferando *in vivo*, de entrar en meiosis y dar lugar a espermatozoides funcionales (9).

Una vez se consiguió mantenerlas en cultivo y diferenciarlas *in vivo*, el siguiente paso fue diferenciar las espermatogonias *in vitro*. En 2014, se comprobó que, añadiendo ácido retinoico a un cultivo de espermatogonias, estas entraban en meiosis y daban lugar a células haploides: espermátidas. En los últimos años, además, se han creado sistemas de cultivo 2D de espermatogonias que permiten que se diferencien a espermátidas bajo la acción del ácido retinoico, y cultivos 3D con células de Sertoli. Estos últimos permiten la obtención de una mayor cantidad de células haploides. Sin embargo, no se ha comprobado si las espermátidas obtenidas *in vitro* tienen capacidad para fecundar óvulos a día de hoy, al contrario de las generadas *in vivo* a partir del trasplante de espermatogonias proliferadas *in vitro* (9).

A la vez, y dadas las dificultades encontradas en la diferenciación de espermatogonias en el laboratorio, se comenzó a investigar cómo obtener gametos *in vitro* a partir de otras células precursoras más indiferenciadas: las PGCs. Así, en 2011, se consiguió crear una especie de testículos y ovarios artificiales de ratón con ellas. Se tomaron células somáticas gonadales masculinas y femeninas, respectivamente, y se reagregaron con PGCs *in vitro*. Luego, se trasplantaron a los riñones de individuos estériles, resultando en la creación *in vivo* de pseudotúbulos seminíferos en los ratones, que produjeron espermátidas identificadas por morfología y los marcadores MVH y VASA/DDX4, y pseudofolículos en las ratonas, productores de vesículas germinales identificadas por morfología. La mitad de las VGs se consiguieron madurar *in vitro* y se fecundaron con las espermátidas. La mayoría fecundaron y dieron lugar a embriones, que se transfirieron, resultando en nacidos vivos en una proporción muy baja. Un punto positivo es que eran fértiles y tuvieron descendencia. Sin embargo, la frecuencia de producción de gametos por parte de las pseudogónadas de sus progenitores era extremadamente baja (9). Además, hay que tener en cuenta que la falta de maduración de las células redondas, así como la maduración *in vitro* de VGs, puede haber tenido una repercusión en su epigenética y en la de los embriones. Quizás podría repercutir en generaciones posteriores también, por lo que, aunque fue un paso adelante, quedaba mucho camino por recorrer antes de probar algo parecido en humanos.

Tras varios intentos por parte de diferentes grupos de diferenciar PGCs humanas a espermátidas *in vitro* en modelos 2D y 3D, se consiguió definitivamente en 2020 con el que parece ser el mejor modelo 3D obtenido hasta el momento. Se trata de pseudotestículos humanos creados mediante la agregación de células somáticas gonadales y PGCs, que fueron capaces de desarrollar túbulos seminíferos productores de espermátidas euploides sin necesidad de trasplantarlos previamente a un individuo. La clave fue suplementar el medio con GDNF, bFGF y EGF para mantener la renovación de las células troncales de los túbulos seminíferos, añadir ácido retinoico para inducir la diferenciación celular y eliminarlo para promover la meiosis, hecho que apoya la hipótesis sobre los mecanismos moleculares implicados en la “toma de decisión” de las espermatogonias de proliferar o diferenciarse. Además, también tuvo lugar la espermiogénesis, pues se apreció el comienzo de la formación de flagelos y acrosomas. Las espermátidas obtenidas presentaban un patrón epigenético equivalente al de un espermatozoide “natural” (al menos para los genes de impronta analizados) y fueron capaces de fecundar ovocitos y dar lugar a un desarrollo embrionario temprano correcto con una frecuencia equivalente al de espermátidas obtenidas *in vivo* (10). Es decir, hoy en día se está a punto de llegar al final del proceso de producción de espermatozoides funcionales *in vitro* con resultados

equivalentes a los obtenidos *in vivo* en humanos. No obstante, habría que poner a prueba su capacidad de fecundar y dar lugar a un desarrollo embrionario correcto y nacidos vivos sanos, que es más complicado probar con ovocitos humanos debido a restricciones éticas y legales.

Respecto a los gametos femeninos, entre 2000 y 2009 se identificaron: algunos genes activos durante la diferenciación de los gonocitos a ovogonias, como *SOHLH1*, *FIGLA*, *NOBOX*, *BOULE* y *STRA8*; el gen *SCP*, que se expresa en células que están entrando en meiosis, y los genes *GDF9* y *ZP*, activos en la fase folicular e indicativos, por tanto, del crecimiento y maduración de los ovocitos previo a la ovulación (Figura 5) (2). Sin embargo, todavía existe mucho desconocimiento respecto a los factores responsables de dichos cambios.

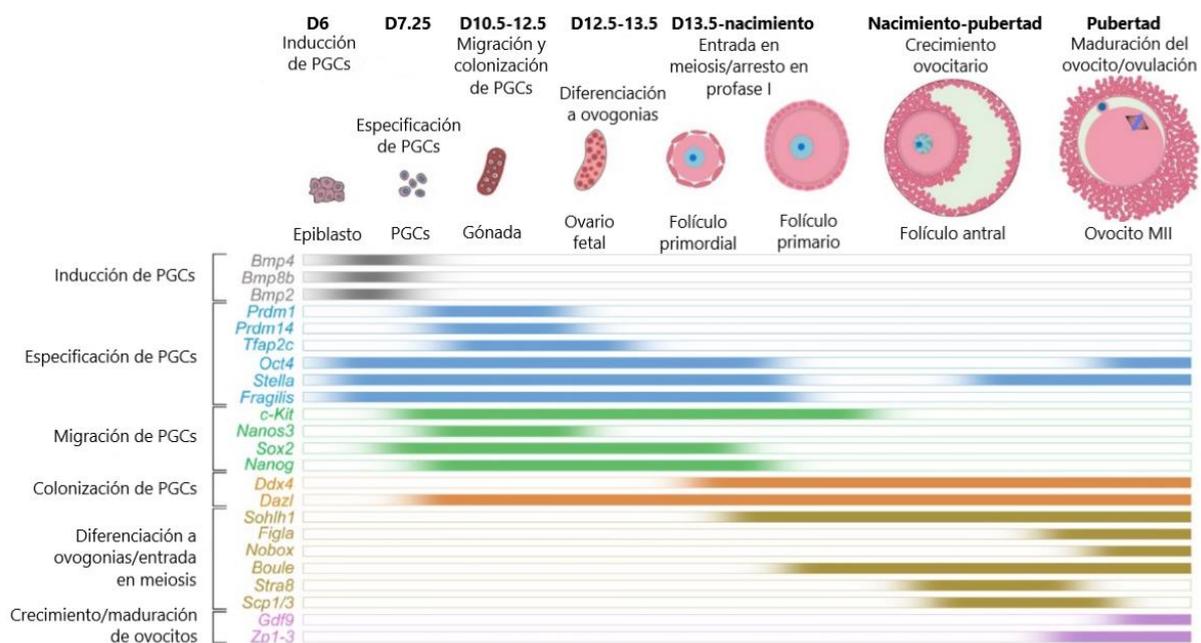


Figura 5. Perfil de expresión génica conocido durante las distintas fases de la diferenciación celular a la línea germinal femenina. D = día de vida embrionaria (adaptado de 2).

Curiosamente, se comenzó a intentar madurar células precursoras de ovocitos humanos *in vitro* antes que células precursoras de ovocitos de otros animales. Robert Edwards y su equipo extrajeron **folículos antrales** del tejido ovárico y fueron los primeros en conseguir madurarlos *in vitro* en 1965. Sin embargo, sería más adelante cuando se comenzaría a investigar con células animales y humanas para dar con las claves de éxito de este método (2).

La primera publicación en la que se investiga el cultivo de **folículos preantrales** *in vitro* data de 1989. Se aislaron complejos cúmulo-ovocito de ovarios de ratonas y se cultivaron en el laboratorio en medio MEM suplementado con suero fetal bovino, ácido pirúvico y FSH. Se pudo observar el crecimiento de los ovocitos, la descondensación de la membrana nuclear de la vesícula germinal y la extrusión del primer corpúsculo polar en casi el 80% de los casos. Posteriormente, se fecundaron los ovocitos y se comprobó que algunos embriones eran capaces

de llegar al estadio de blastocisto. Se transfirieron embriones de entre 2 y 4 células al oviducto de ratonas receptoras y, sorprendentemente, aun sin conocer los mecanismos moleculares de la gametogénesis y embriogénesis, este experimento dio lugar a 7 nacidos vivos (2).

Como se comentaba anteriormente, este tema fue investigado con más profundidad a partir de los 90, siguiendo diferentes estrategias cuyo objetivo era conseguir una mayor tasa de éxito:

- A. Extrayéndose los ovarios de ratonas recién nacidas y cultivándose *in vitro*, en 1996 se observó el crecimiento de los **folículos primordiales** en ellos. Se aislaron complejos cúmulo-ovocito, que fueron cultivados en un medio suplementado con FSH y EGF. Casi todos sobrevivieron bajo estas condiciones, pero solamente un 22% maduraron, menos de la mitad fecundaron correctamente y solo un 2% de los embriones llegaron a estadio de blastocisto. También se intentó conseguir nacidos vivos transfiriendo embriones en estadio de dos células a hembras receptoras, pero el éxito del procedimiento fue algo anecdótico: dos nacimientos, de los cuales solo una cría sobrevivió (2).
- B. Una variante del anterior protocolo, en el que se cultivaron los complejos cúmulo-ovocito en medio α MEM (que contiene menos cantidad de glucosa y más de ácido ascórbico) sin FSH, consiguió aumentar significativamente el número de ovocitos VG y MII y, por tanto, de embriones obtenidos en 2003. Otra de las claves fue individualizar el tiempo de cultivo dependiendo del tamaño de los folículos. Cuanto más pequeños, más tiempo necesitan para crecer. También se consiguieron más nacidos vivos a partir de la transferencia de embriones en estadio de dos células que con el anterior protocolo. Sin embargo, el porcentaje todavía no era comparable al de una fecundación *in vivo* (2).
- C. También se intentó obtener ovocitos a partir de **folículos secundarios** de ratonas jóvenes en 2010. Se cultivaron los ovarios en medio α MEM con FSH e insulina, para conseguir folículos secundarios, y estos se extrajeron para luego introducirlos en perlas de alginato con medio α MEM y suero fetal de ternera, constituyendo, así, una especie de folículos artificiales. Una vez hubieron crecido, se extrajeron y maduraron los complejos cúmulo-ovocito en medio α MEM con suero fetal de ternera, gonadotropina coriónica humana (hCG) y EGF y se fecundaron. Se consiguió, así, más cantidad de ovocitos maduros (2).
- D. Basándose en el anterior modelo, se intentó algo parecido en 2013 partiendo de **folículos primarios y secundarios tempranos**, que se cultivaron primero en un gel con colágeno y después en una membrana recubierta de colágeno. El 90% de los ovocitos llegó a estadio de MII. Se fecundaron, se transfirieron los embriones obtenidos y se consiguieron dos nacidos vivos que obtuvieron descendencia, por lo que se les consideró “normales” (2), pero no se les hizo ningún estudio genético ni epigenético.

Igualmente, en esta época, se maduraron folículos humanos *in vitro* con procedimientos parecidos: extrayendo los complejos cúmulo-ovocito y cultivándolos en medio α MEM y utilizando métodos de cultivo en dos y tres pasos en sistemas 2D y 3D, llegando a conseguirse VGs y ovocitos MII. Sin embargo, la tasa de éxito actual sigue siendo demasiado baja (2).

La principal problemática encontrada es la falta de conocimiento acerca de todos los factores implicados en el desarrollo de folículos primordiales y primarios hasta el estadio de folículo secundario (hormonas, factores de crecimiento, comunicación con otras células, etc.). De esta manera, es complicado que la tasa de éxito en la obtención de ovocitos maduros *in vitro* sea alta. El mejor escenario en investigación parece ser aislar los ovarios y mantenerlos en cultivo, de manera que se conserva la comunicación autocrina y paracrina existente *in vivo*. No obstante, para la aplicación de algo parecido en clínica, apostar por sistemas biológicos en 3D formados por células somáticas del ovario podría tener un mejor futuro. Así, se evitaría mantener tejido ovárico, folículos y/u ovocitos tanto tiempo en uno o varios cultivos en serie, lo cual podría tener consecuencias en la epigenética del gameto (2).

En 2004, se demostró que los ovarios de ratonas, ratas y humanas recién nacidas y jóvenes contienen también células troncales que pueden diferenciarse a la línea germinal. Aunque fue fuente de debate debido a la creencia arraigada de que las hembras nacen con un número determinado de folículos que se van perdiendo con los años, más adelante, se comprobó que este tipo celular se localiza en el epitelio de los ovarios, que tiene actividad telomerasa, fosfatasa alcalina, los genes de impronta femenina parcialmente metilados, los de impronta masculina desmetilados y que expresan los genes *OCT4*, *BLIMP1*, *DAZL*, *STELLA*, *MVH*, *FRAGILIS* y *REX1*, mientras que no expresan *C-KIT*, *FIGLA*, *SOX2*, *NANOG*, *SCP1-3* ni *ZP3*, lo que confirmó que se trataba de células indiferenciadas. Este hallazgo proveería una nueva fuente de la que obtener ovocitos de los ovarios, parecida a la existente en los testículos. Así se comprobó en 2009, cuando se trasplantaron dichas células a ovarios de ratonas sometidas previamente a una quimioterapia. Incluso se observó que los ovocitos producidos a partir de ellas daban lugar a nacidos vivos por fecundación natural en más del 80% de los casos y que estos eran fenotípicamente normales y fértiles (2).

Sin embargo, la aplicación de este procedimiento en clínica en humanos no sería posible si esta población celular no existiese en la edad adulta, por lo que la comunidad científica comenzó a investigar si se diferenciaban todas tras el nacimiento. A partir de 2016, comenzó a haber pruebas más sólidas de que esta población celular persiste en los ovarios de varias especies de mamíferos en la edad adulta, incluida la humana, y que contribuyen a la formación de nuevos ovocitos (2). Quizás en un futuro próximo se comiencen a dilucidar los factores que son

necesarios para su cultivo y diferenciación *in vitro*, lo cual permitiría obtener más ovocitos de pacientes con baja reserva. Hasta la fecha, se han aislado este tipo de células de ovarios de mujeres postmenopáusicas y con fallo ovárico precoz, consiguiéndose estructuras parecidas a ovocitos que expresan *OCT4* y *ZP3*, tras cultivarlos con células somáticas del ovario, sobre una monocapa de fibroblastos o con espermatozoides, pero todavía queda mucho por investigar (2).

4.2.2. Haploidización

Es una técnica desarrollada a principios de los 2000, que consiste en introducir el núcleo de una célula somática (2N/2C) en el citoplasma de un ovocito enucleado en MII, con el objetivo de conseguir una célula haploide, tras llevarse cabo la segunda división meiótica (5)(11) (Figura 6A). Debido a que el citoplasma del ovocito está programado para llevar a cabo la meiosis, al introducir el material genético de una célula somática en él, sin entrar en la fase S del ciclo celular, se activa su condensación y se segrega gracias al huso meiótico, es decir, el ovocito lo trata como material genético propio y lleva a cabo la haploidización (2)(5)(11). Esta técnica permitiría obtener gametos a partir de células somáticas de pacientes estériles o infértiles o un gameto del sexo contrario en el caso de parejas homosexuales masculinas (11).

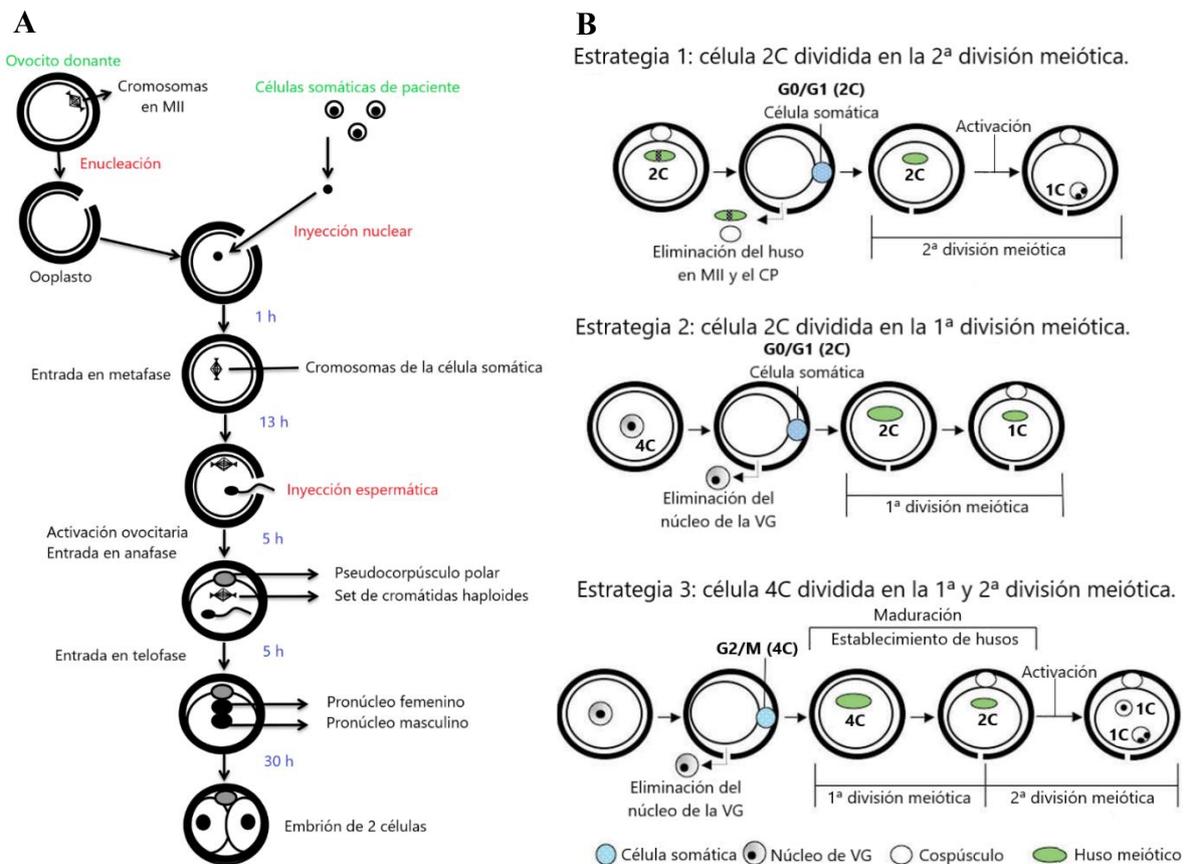


Figura 6. A. Fases de la haploidización de células somáticas en ovocitos MII y fecundación del pseudoovocito obtenido (adaptado de 5). B. Estrategias para haploidizar células somáticas en ovocitos enucleados. CP = corpúsculo polar. VG = vesícula germinal (adaptado de 11).

El primer intento de haploidización se realizó en el año 2001, introduciendo el núcleo de una célula del cúmulo humana en el citoplasma de un ovocito humano enucleado. Se observó la formación de la placa metafásica tras 13h de cultivo. Después, se microinyectó un espermatozoide en el pseudoovocito. Este primer contacto con la técnica fue exitoso, pues todos los pseudoovocitos fecundaron y los embriones se desarrollaron hasta el estadio de dos células adecuadamente, momento en el se congelaron (Figura 6A). Gracias a este resultado, se comenzó a experimentar con células de ratón para determinar la fiabilidad de la técnica (2)(5).

Existen tres métodos para haploidizar células somáticas (Figura 6B):

1. Introducir el núcleo de una **célula somática en fase G0 o G1 (2N/2C)** en el citoplasma de un **ovocito en MII (1N/2C)**. Esto permite llevar a cabo la segunda división meiótica, en la que se separan las cromátidas hermanas. Sin embargo, como las células somáticas en fase G0/G1 carecen de ellas, se produce la segregación de los cromosomas homólogos, dando lugar a dos células haploides (1N/1C). El problema es que los cromosomas se desplazan aleatoriamente a alguno de los dos polos, por lo que puede haber una falta o exceso de cromosomas en las células resultantes (2)(11).
2. Introducir el núcleo de una **célula somática en fase G0 o G1 (2N/2C)** en el citoplasma de un **ovocito VG en fase G2 o M (2N/4C)**. Tras la primera división meiótica, se obtienen dos células 1N/1C. No debería existir el mismo problema que en el anterior caso, pues esta división tiene el objetivo de separar cromosomas homólogos. Sin embargo, en la meiosis I estos se alinean juntos en la placa metafásica gracias a la formación de quiasmas y díadas, lo que permite que cada uno se una a los microtúbulos de un polo y haya un reparto equitativo del material genético. Dichas uniones no existen en cromosomas homólogos de células somáticas, lo que da lugar a errores de segregación tras la primera división meiótica (2)(11).
3. Introducir el núcleo de una **célula somática en fase G2 o M (2N/4C)** en el citoplasma de un **ovocito VG en fase G2 o M (2N/4C)**. Es una versión mejorada del anterior, en el que se solventa el problema en el número de copias de ADN del primer método, al encontrarse el material genético de la célula somática duplicado. A diferencia del segundo método, se realizan las dos divisiones meióticas, obteniendo células 1N/1C. El problema radica en la incertidumbre del resultado de la primera división, pudiendo obtenerse células 2N/2C o 1N/2C, al separarse primero los cromosomas homólogos o las cromátidas hermanas, respectivamente, debido a la ausencia de quiasmas y díadas. Para solucionarlo, se podría aplicar ingeniería genética para que la célula expresase proteínas de unión de los cromosomas homólogos. Así, se alinearían correctamente en

la placa metafásica, pero esto implicaría más tiempo y problemas legales y éticos si se quisiese aplicar esta técnica en humanos (2)(11).

Así se ha conseguido la fecundación de células animales y humanas haploidizadas, aunque con baja tasa de éxito: 30% de llegada a blastocisto y 1-2% de gestación a término en ratones. En ningún caso se reportó un desarrollo embrionario y nacidos vivos normales (2)(5)(11).

Debido a la reprogramación nuclear inapropiada, a la descoordinación entre la reprogramación del núcleo del espermatozoide y el del óvulo y a las aneuploidías originadas en los ensayos con animales, nunca se transfirieron los embriones humanos obtenidos mediante esta técnica y se prohibió su uso en clínica en muchos países. En la actualidad, se está trabajando con distintos medios de cultivo para intentar mejorar la segregación cromosómica y el desarrollo embrionario, suplementándolos con cafeína e inhibidores de la deacetilasa de histonas (2)(5).

Por otro lado, se ha probado también la haploidización *in vitro* en células germinales con mejores resultados. La clave está en que el ovocito receptor del material genético se encuentre en la misma fase de la meiosis que la célula de la que se obtiene el núcleo (2)(11):

- **Espermatocitos primarios (2N/4C):** se transfiere su material genético a ovocitos en VG (2N/4C), consiguiéndose espermátidas tras dos divisiones meióticas.
- **Espermatocitos secundarios (1N/2C):** se transfiere su material genético a ovocitos enucleados MII (1N/2C), obteniéndose espermátidas tras la segunda división meiótica.
- **Ovocitos de neonato y de ovarios juveniles (2N/4C):** se transfiere su material genético a ovocitos en VG (2N/4C), lo que permite el reinicio de la meiosis *in vitro*.
- **Primer corpúsculo polar (1N/2C):** se transfiere su material genético a ovocitos en MII (1N/2C). Tras la segunda división meiótica, se obtienen ovocitos 1N/1C.

La ventaja de esta versión es que no existen problemas en la alineación de los cromosomas en la placa metafásica, al contrario que con las células somáticas, pues se trata de material genético de células en meiosis, que, por tanto, forma quiasmas y díadas (11).

La efectividad del uso de espermátidas obtenidas mediante haploidización de espermatocitos primarios y secundarios ha dado origen a fecundación de ovocitos “naturales” y a un posterior desarrollo embrionario completo en modelos animales (2)(5)(11). Sin embargo, no se ha podido completar el proceso de espermiogénesis posterior y es necesario un estudio detallado de la descendencia para comprobar si existen cambios en el patrón epigenético en consecuencia. Con los pseudoovocitos se ha conseguido descendencia “viable” (11), aunque que esta nazca viva y con un fenotipo aparentemente normal, no quiere decir que su genética, epigenética, fisiología,

su fertilidad y/o su esperanza de vida sea equivalentes a la de un individuo de su misma especie concebido a partir de gametos “naturales”. Hace falta definir bien este concepto y estudiar más en profundidad la descendencia y las siguientes generaciones para poder afirmar que la técnica es exitosa. También sería interesante comprobar si se podría producir una fecundación y desarrollo embrionario correctos con dos gametos obtenidos mediante esta técnica y comparar la descendencia “viable” con aquella creada de manera natural.

En resumen, tienen que conseguirse 3 hitos para que los procedimientos descritos funcionen:

- 1) La haploidización (5).
- 2) Una reprogramación epigenética para conseguir células totipotentes en caso de aplicarse en células somáticas (5).
- 3) En el caso de un ovocito artificial, este tiene que contener niveles suficientes de ARNm para que el embrión pueda desarrollarse hasta el estadio de mórula, a partir del cual comienza a fabricar su propio ARNm (5).

A pesar de los avances y propuestas de mejora, no se ha llegado a optimizar la técnica lo suficiente como para considerar su uso en células somáticas en clínica debido a las aneuploidías que ocasiona. Hay autores que consideran que esta técnica es prometedora y, por tanto, se deberían seguir investigando las repercusiones reales de su aplicación en los embriones resultantes, comprobando si son capaces de llegar a estadio de blastocisto, tras lo cual se analizarían mediante un test genético preimplantacional para aneuploidías para comprobar el impacto real de la alineación anómala de los cromosomas en la placa metafásica (5).

Además de las repercusiones que la haploidización de células somáticas para la obtención de gametos puede tener sobre la dotación genética del embrión, otra razón por la que se dejó de investigar este procedimiento fue que, a la par, se comenzó a trabajar con células pluripotentes, cuyos resultados parecían ser más prometedores (5)(11).

4.2.3. Diferenciación de ESCs

Esta técnica es resultado de la combinación de algunas de las anteriores. El objetivo es obtener células pluripotentes que diferenciar a la línea germinal. Para ello, se necesita un ovocito enucleado al que se transfiere el núcleo de una célula somática del paciente. A continuación, se le somete a un choque eléctrico, provocando su división y dando lugar a un embrión. En el día 5 de desarrollo, se toman las células de la MCI y se cultivan en un medio específico para inducir su diferenciación a la línea germinal (9)(11).

La técnica de diferenciación celular de ESCs *in vitro* se comenzó a desarrollar por primera vez en la década de los 80, cuando se obtuvieron los primeros tipos celulares: células sanguíneas,

cardíacas, musculares, hepatocitos, neuronas, etc. (4)(11). Sin embargo, no fue hasta el principio de los 2000 cuando se reportaron los primeros casos de gametos murinos originados a partir de ellas, algunos capaces de fecundar y dar lugar a un embrión temprano (11). En concreto, las primeras células germinales masculinas creadas *in vitro* a partir de ESCs se obtuvieron en 2003. Para ello, primero, se les insertó el gen *MVH*. Después, se cultivaron con células del trofoblasto y con células productoras de BMP4, obteniendo PGCs con borrado epigenético en genes de impronta y espermatogonias a partir de ellas. Finalmente, recreando el ambiente testicular *in vitro*, se obtuvieron espermátidas (9).

El primer reporte de estructuras similares a ovocitos de ratona obtenidos a partir de ESCs data de 2003. Sin embargo, no se fecundaron, por lo que no se sabe si eran capaces de dar lugar a un embrión viable (2). En 2004, se fecundaron ovocitos naturales por primera vez con espermátidas obtenidas a partir de ESCs *in vitro*, dando lugar a embriones que llegaron a estadio de blastocisto con una morfología normal y genoma diploide, aunque no se analizó su epigenoma (9). A partir de entonces, se comenzó a investigar con cuerpos embrioides (agregaciones de ESCs) que, espontáneamente, se diferenciaban a células de la línea germinal. Para ello, se cultivaron ESCs en un medio condicionado utilizado para el cultivo de testículos, con GDF-9, BMP-4, SCF, LIF e IGF-I. En 2006, este protocolo dio lugar a una especie de ovarios, que contenían estructuras parecidas a ovocitos inmaduros de pequeño tamaño con expresión de *ZP3* y que estaban rodeadas de células parecidas a las de la granulosa (2). También se intentó diferenciar ESCs a ovocitos cultivándolos junto con células de la granulosa en 2007, pero no se consiguieron células haploides (2). Es decir, parece que la recreación del ambiente del ovario, con más variedad celular, es importante para completar la meiosis.

La diferenciación espontánea a células de la línea germinal femenina también se ha conseguido con embrioides formados por ESCs humanas de forma similar, aunque, más adelante, se averiguó que se podía inducir directamente añadiendo BMP4, BMP7 y BMP8b al medio de cultivo. También se ha demostrado que la diferenciación es más rápida cuando se cultivan las células sobre fibroblastos de embriones de ratón y cuando se añade bFGF y ácido retinoico al medio (2). Sin embargo, no hay muchas publicaciones que hayan conseguido ovocitos a partir de ESCs, solo estructuras parecidas a ellos, que, normalmente, carecen de zona pelúcida. Queda, por tanto, bastante por investigar en este campo.

Otras estrategias que se han ido probando para conseguir gametos a partir de ESCs son:

- Utilizar medio de cultivo rico en glucosa y transfectar ESCs con los genes *STRA8* y *BLIMP1*. En presencia de ácido retinoico, como se explica en apartados anteriores, estos

genes se activan, permitiendo la diferenciación a la línea germinal masculina, la proliferación celular de las espermatogonias obtenidas y la inhibición de su apoptosis. A continuación, se elimina LIF del medio de cultivo para inducir la entrada en meiosis, llegando al estadio de espermátidas con un comienzo de cola. Estas fueron capaces de fecundar ovocitos y de dar lugar a descendencia que llegó a la edad adulta (9).

- Sobreexpresar el gen *DAZL*, marcador de la línea germinal, que inhibe a *NANOG*, un gen de pluripotencia. Esto permitió la diferenciación de ESCs, dando lugar tanto a espermatozoides con motilidad flagelar como a ovocitos con alta expresión de *ZP1* y baja expresión de *ZP2* y *ZP3*. Los espermatozoides fueron capaces de fecundar ovocitos “naturales”, pero los embriones no llegaron a estadio de blastocisto (9).
- Cultivar PGCs obtenidas a partir de ESCs junto con células somáticas del testículo en un medio con Activina A, BMPs y ácido retinoico. Así, se silencian *BLIMP1* y *STELLA* y se activa *STRA8*, con lo cual las células entran en meiosis (9).
- Sobreexpresar *EIF2S3Y* en ESCs. Este gen codifica para la subunidad gamma del factor de iniciación de la transcripción EIF2. Está activo tanto en la proliferación como en entrada en meiosis natural y parece que su sobreexpresión potencia la acción de los inductores de la diferenciación celular del medio y la entrada en meiosis (9).

4.2.4. Diferenciación de iPSCs

Las células pluripotentes inducidas (iPSCs) se obtienen a partir de células somáticas unipotentes, capaces de dar lugar a solamente un tipo celular, que se desdiferencian a un estado de pluripotencia *in vitro*. Para ello, debe tener lugar un borrado epigenético que permita la expresión de genes que fueron silenciados durante el proceso de diferenciación de la célula original. Existen dos tipos de células pluripotentes: a) prime y b) naïve, siendo las segundas las que más borrado epigenético presentan. Esto permite dar lugar a una variedad mayor de células.

Las primeras iPSCs se obtuvieron en 2006 sobreexpresando los factores de transcripción OCT3/4, SOX2, C-MYC y KLF4 en fibroblastos de ratón. Esto dio lugar a células parecidas a las ESCs en morfología, patrón de expresión génica, patrón epigenético y capacidad de proliferación, diferenciación y de formación de cuerpos embrioides y teratomas. En 2007, se consiguieron las primeras iPSCs humanas, con dos protocolos distintos prácticamente a la vez: con el anteriormente descrito por el grupo de Yamanaka, y con el de Thompson, que consiste en la sobreexpresión de OCT3/4, SOX2, NANOG y LIN28. A partir de entonces, comenzó a investigarse cómo obtener distintos tipos celulares a partir de iPSCs *in vitro*, primero con células animales y, después, con humanas (5)(9).

Los primeros ovocitos los consiguió, en 2009, el grupo de Hayashi. Para ello, se expusieron iPSCs de ratona a bFGF y Activina A para obtener células parecidas a las del epiblasto embrionario, con capacidad de autoregeneración, reprogramación epigenética, reactivación del cromosoma X, desmetilación del ADN y expresión de genes marcadores de pluripotencia. Estas se expusieron a BMP4, LIF, SCF y EGF, obteniendo células parecidas a las células germinales primordiales (PGCLCs), que, al ponerse en contacto con células somáticas de la gónada femenina y con un inhibidor de estrógenos, dieron lugar a ovocitos primarios. Estos se maduraron *in vitro* en un medio con FSH y, luego, con FSH, EGF y hCG. Tras su fecundación, desarrollo embrionario y transferencia, se obtuvo descendencia sana (5).

Posteriormente, se llevó a cabo una variante de este protocolo, en el que se crearon ovarios *in vitro* con las PGCLCs de ratón obtenidas y células somáticas gonadales, que fueron trasplantados a ratonas infértiles. Se obtuvieron, así, ovocitos que fueron fecundados y embriones que fueron transferidos al útero materno y que llegaron a término. Los resultados fueron mejores que diferenciando las PGCLCs *in vitro*, por lo que el injerto parece ser un paso importante para la eficiencia de la técnica (2).

La primera vez que se obtuvo descendencia en ratones mediante estos procedimientos fue en 2012, aunque todavía hay dudas sobre si el borrado epigenético de las células somáticas originales para dar lugar a células pluripotentes es completo, si son células iguales a las obtenidas de embriones “naturales” y si la descendencia es igual genética, epigenética y fisiológicamente a la obtenida de forma natural (5).

Tras el avance en modelos animales, comenzó a aplicarse este protocolo en células humanas. Sin embargo, la tasa de éxito en la obtención de ovocitos MII a partir de PGCLCs era menor al 5%, debido a que con el protocolo de desdiferenciación se conseguían células pluripotentes prime, probablemente por discordancias especie-específicas en el proceso de diferenciación celular. En 2013, se elaboró un nuevo protocolo para conseguir células naïve a partir de las prime y, en 2014, se obtuvieron PGCLCs humanas *in vitro* a partir de ellas. Sin embargo, este nuevo método tampoco es perfecto, pues el patrón de expresión génica difiere un poco del de las PGCs “naturales” maduras (no expresan *DDX4* ni *DAZL*), el porcentaje de ovogonias que se obtienen es bajo y estas no son capaces de dar lugar a ovocitos (5), por lo que hoy en día todavía no se ha conseguido resolver la incógnita de cómo conseguir gametos femeninos maduros a partir de iPSCs humanas.

Algunos autores han propuesto combinar estos protocolos con la técnica de haploidización: el núcleo de las ovogonias obtenidas a partir de la diferenciación *in vitro* de iPSCs se introduciría

en VGs enucleadas para obtener ovocitos (5). Sin embargo, para ello sería necesario mejorar primero el protocolo de diferenciación celular, ya que una tasa de éxito tan baja en la obtención de ovogonias y una nula obtención de ovocitos a partir de iPSCs humanas es indicativo de que existe una falta de conocimiento acerca de la diferenciación celular en nuestra especie, al investigar principalmente con células de ratón. Lo mismo ocurre con las consecuencias epigenéticas de imitarlos *in vitro*. Sería prudente ahondar primero en estos temas antes de adentrarse en procedimientos tan complejos con células que probablemente no presenten un patrón epigenético equivalente al de ovogonias humanas “naturales”.

Por otro lado, en 2010, se obtuvieron las primeras células germinales masculinas, que expresaban el marcador MVH, a partir de iPSCs de ratón. El protocolo es más complejo que para la formación de ovogonias, pues fue necesario un cocultivo con EGF y células de tipo M15 secretoras de BMP4, a las que previamente se les insertó el gen *GDNF* (9).

En 2012, se utilizó otro protocolo más simple, con el que se obtuvieron espermatogonias a partir de iPSCs. Se cultivaron en un medio sin LIF, lo que dio lugar a embrioides que expresaban marcadores de la línea germinal masculina: VASA, C-KIT y SCP3. Estos fueron expuestos a ácido retinoico. Las espermatogonias obtenidas se trasplantaron a testículos de ratones infértiles y se pudo comprobar que se diferenciaban *in vivo* hasta el estadio de espermátidas (9). Además, se realizó por primera vez un injerto de iPSCs disgregadas de cuerpos embrioides y células del testículo en la piel del dorso de ratones, obteniéndose estructuras similares a túbulos seminíferos. Las células germinales derivadas de estas iPSCs se localizaban en la base de los túbulos, al igual que las espermatogonias “naturales” (9).

Fue poco después de conseguir gametos masculinos de ratón *in vitro* cuando se obtuvieron los primeros gametos masculinos de humano a partir de la diferenciación de iPSCs. En 2011, se cultivaron iPSCs humanas sobre una monocapa de fibroblastos y se añadió medio rico en ácido retinoico al cultivo. Después de un tiempo, se seleccionaron células según marcadores de superficie propios de la línea germinal y se cultivaron en un medio rico en LIF, bFGF, FRSK y un inhibidor del CYP26. Se observó que, a medida que pasaba el tiempo, las células dejaban de expresar genes de pluripotencia y expresaban marcadores de la línea germinal, como *VASA*, es decir, se estaban diferenciando. También se encontraron células con marcadores propios de células de Sertoli y de Leydig, indicativo de que se podría estar formando algo parecido al tejido testicular. El resultado final fue espermátidas que mostraban un patrón epigenético de algunos genes improntados parecido al de espermatozoides “naturales”. Sin embargo, el rendimiento de la técnica es bajo, pues solamente un 2.3% de las células eran haploides. En 2019, se probó a

utilizar un cultivo 3D en lugar de 2D para intentar mejorar este porcentaje, pero seguía siendo demasiado bajo, con un 3.95% de formas haploides (9).

En definitiva, todavía quedan mucho conocimiento por adquirir en este campo. Sin embargo, hay autores que consideran necesario seguir investigando con iPSCs para conseguir células germinales humanas viables debido a las ventajas que tiene su utilización frente a la de ESCs humanas: menos restricciones éticas, al proceder de células somáticas del paciente, mientras que para obtener ESCs es necesaria la creación y destrucción de un embrión humano (9).

4.2.5. De iPSCs masculinas a ovocitos

La reciente publicación de Murakami y colaboradores (12) relata cómo consiguieron obtener gametos femeninos a partir de iPSCs de ratones. Tras varios pasos, tomaron aquellas células que, aleatoriamente, perdieron el cromosoma Y (X0). Después, duplicaron el cromosoma X que quedaba añadiendo reversina (un inhibidor del punto de control del huso) a baja dosis al medio para promover el reparto desigual de cromosomas. Así, se obtuvieron iPSCs XX cuyos cromosomas sexuales tenían los mismos polimorfismos, lo que demostró que eran clones. Además, se trataba de células euploides, sin inserciones ni deleciones y cuyos autosomas no estaban afectados. Sin embargo, los autores aceptan que se necesita más investigación a este respecto y que podría ser perjudicial si existiese una mutación recesiva en el cromosoma X.

A continuación, indujeron la diferenciación a PGCs, que se obtuvieron en una proporción equivalente a la conseguida en la diferenciación de ESCs femeninas. Además, se produjo la inactivación de uno de los cromosomas. Después, cultivaron las PGCs junto con células somáticas gonadales en un medio condicionado para la diferenciación celular, consiguiendo una cantidad de células troncales precursoras de la línea germinal parecida a la obtenida de la diferenciación de PGCs obtenidas de ESCs femeninas. Luego, se diferenciaron a VG y se maduraron *in vitro* a estadio MII con un porcentaje de éxito comparable al de la diferenciación de PGCs obtenidas a partir de ESCs femeninas y con un transcriptoma igual al de ovocitos “naturales”. Sin embargo, el gen *PARP8* estaba sobreexpresado y, aunque no parece que tenga un efecto negativo en la ovogénesis, no se puede descartar su total inocuidad. Estos ovocitos se fecundaron con espermatozoides “naturales” y los embriones resultantes se transfirieron al oviducto de hembras receptoras en estadio de dos células. Solamente el 1.1% dio lugar a nacidos vivos, pero tenían un peso normal, llegaron a la edad adulta y eran fértiles. Es un porcentaje mejorable, pero también es un paso bastante grande en una técnica tan complicada y novedosa.

Este protocolo permitiría a parejas formadas por dos hombres obtener gametos femeninos que fecundar con sus espermatozoides y, así, tener descendencia genéticamente relacionada con

ambos en un futuro. Además, los autores encontraron una forma de identificar las células con duplicación del cromosoma X sin introducir un gen *reporter*, lo cual facilitaría la tarea de llevarlo a clínica. Descubrieron que la expresión del gen *CD38* es mayor en ESCs e iPSCs XX respecto a las originales X0. Sin embargo, la eficiencia en el aislamiento de células XX con un anticuerpo anti-CD38 fue de tan solo un 22%. Además, esto lo realizaron en ESCs, por lo que sería necesario repetirlo con iPSCs para confirmar los resultados.

4.3. Embriones artificiales

4.3.1. Partenogénesis

La partenogénesis es un fenómeno que tiene lugar en algunas especies animales en el que se crea un embrión a partir de solamente un ovocito, sin necesidad de un espermatozoide que lo fecunde. No es posible en mamíferos de forma natural, aunque se ha conseguido activar la división de ovocitos inmaduros *in vitro*, llegando a etapas tempranas del desarrollo embrionario. Sin embargo, no es posible llevarlo a término con éxito, puesto que faltan los genes de impronta paterna necesarios para inducir la formación de la placenta. Además, los de impronta materna se encuentran sobreexpresados, lo que causa anomalías del desarrollo embrionario. Por ello, no es una técnica que se pudiese llegar a aplicar en clínicas de fertilidad para mujeres solteras, pero sí serviría para la investigación de las etapas tempranas del desarrollo embrionario y en el campo de la medicina regenerativa (13).

Las estrategias que han funcionado en algunos modelos animales se basan en la recreación de las oscilaciones de Ca^{++} , que se producen cuando un espermatozoide fecunda un ovocito, de forma **química o física**. Los ionóforos de Ca^{++} , la ionomicina, el etanol o el cloruro de Sr^{++} se han utilizado desde los 90 para activar a inhibidores de la polimerización de filamentos de actina y de la síntesis de proteínas, de manera que se bloquea la extrusión del segundo CP. Esto tiene diferente grado de éxito dependiendo de la especie, dándose mejores resultados en ratones que en bovinos y humanos. En algunos casos, se extruye el segundo CP, pero se duplica el material genético del ovocito de forma espontánea, de manera que sigue siendo diploide. En otros casos, se extruye el CP y el ovocito se queda haploide (13).

En 2007, Revazova y colaboradores probaron esta estrategia con ovocitos humanos, consiguiendo blastocistos en la mitad de los casos. Mai y colaboradores combinaron este método químico con un choque eléctrico, pero la tasa de éxito fue menor, del 21%. Intentos posteriores consiguieron blastocistos que presentaban un perfil genético y potencial de desarrollo equivalente al de embriones “naturales” humanos. Sin embargo, se necesita estudiar mejor los efectos epigenéticos que el abordaje químico podría tener sobre el embrión (13).

El mayor logro hasta el momento ha sido el nacimiento de dos ratones con la impronta corregida y fenotipo normal en 2004, que dieron lugar a descendencia sana, pero, para ello, Kono y colaboradores necesitaron realizar modificaciones genéticas para eliminar o introducir copias de genes de impronta y, así, regular su expresión. No obstante, la mayoría de los nacidos de este experimento no sobrevivieron o presentaban anormalidades, por lo que queda mucho en lo que trabajar todavía si se desea llegar a etapas más avanzadas del desarrollo (13).

4.3.2. Obtención de embriones a partir de células totipotentes

En las décadas de los 80 y los 90 se consiguió cultivar ESCs, TSCs y XENs *in vitro* por primera vez. Las ESCs fueron las primeras en utilizarse para intentar crear embriones en el laboratorio, al ser precursoras del epiblasto. Para ello, se agregaban, generando **embrioides**, y se esperaba a que, espontáneamente, se diferenciases, pero la tasa de éxito era bastante baja. No sería hasta 2014 cuando se daría el paso al cultivo 2D y 3D, consiguiendo **gastruloideos** o estructuras parecidas a gástrulas. En 2018, se formaron los primeros **blastoides** o estructuras parecidas a blastocistos, agregando ESCs y TSCs, pero con poca capacidad de desarrollo posterior (14).

Sin embargo, algunos grupos decidieron aprovecharse de la totipotencia de las células embrionarias en estadio de 2, 4 y 8 células para crear blastoides *in vitro*, sin necesidad de aportar ningún tipo celular más. Este fue el caso del grupo de Juan Carlos Izpisúa, que consiguió llegar a un estadio posimplantación por primera vez así (14). En 2019, tomaron estas células de embriones tempranos de ratón, las agregaron y colocaron en medio de cultivo, obteniendo tanto ESCs como TSCs y XENs a partir de ellas. Estas fueron capaces de compactarse, desarrollarse hasta un estadio equivalente al de un embrión en día 5-5.5, de inactivar uno de los cromosomas X, de implantar *in vivo*, adquirir la forma cilíndrica posimplantación característica e inducir la decidualización uterina. Los blastoides fueron capaces de formar los tres linajes celulares *in vitro* y el perfil transcriptómico de los mismos era parecido al de blastocistos “naturales”. El tamaño también era comparable al de embriones “naturales” en el mismo estadio. Sin embargo, se detectó en la MCI la presencia de células poco diferenciadas y anormalidades en la metilación de ciertos genes, incluidos genes de impronta, lo cual puede afectar negativamente al desarrollo intrauterino. Además, la eficiencia de formación de blastoides fue de tal solo un 15% del total de agregados iniciales, de los cuales el 32% llegó al estadio posimplantación y solamente el 7% implantó. También probaron a obtenerlos a partir de una única célula inicial, pero solo el 2.7% de los casos fue exitoso, por lo que esta técnica necesita más investigación.

4.3.3. Obtención de embriones mediante la agregación de células troncales

El grupo de Magdalena Zernicka-Goetz consiguió obtener estructuras parecidas a embriones “naturales” en estadio de gástrula en 2017, combinando ESCs y TSCs de ratón en un cultivo

3D, lo que denominaron **embriones ETX**. Para ello, colocaron agregaciones de ESCs, rodeadas de una matriz extracelular, y agregaciones de TSCs, rodeadas del mismo tipo de matriz, en medio de cultivo. Espontáneamente, ambos tipos celulares se unieron con una frecuencia del 22%, aunque no se mezclaron aleatoriamente, sino que había dos partes bien diferenciadas. Después, se pasaron a Matrigel, sustituto del endodermo primitivo, lo que permitió la creación un espacio luminal entre las ESCs, seguido de otro entre las TSCs y, posteriormente, la unión de ambos (**cavidad proamiótica**), formando una estructura cilíndrica semejante a la de gástrulas “naturales”. Este fenómeno tuvo lugar en el 92.68% de los casos (15).

A partir de este estadio, las células de la zona de unión se diferencian a otros tipos celulares en embriones “naturales”: el **mesodermo** y las **PGCs**, gracias a la activación de las rutas Nodal/Activina y Wnt y a la expresión de BMPs. Ambos fueron identificados en los ETX por los marcadores *TFAP2C* (*AP2γ*), *STELLA*, *BLIMP14*, *NANOS3* y *DDX4* de las PGCs y *T/BRACHYURY* del mesodermo. Por otro lado, las TSCs forman el **ectodermo extraembrionario** y el **endodermo primitivo** da lugar al **endodermo visceral**, cuya parte distal expresa inhibidores las rutas Nodal/Activina y Wnt y migra hacia la parte anterior (**endodermo visceral anterior**) (Figura 7). En la zona posterior, dichas rutas están activas, lo que da lugar a la **línea primitiva** y el **mesodermo extraembrionario** (Figura 8) (15).

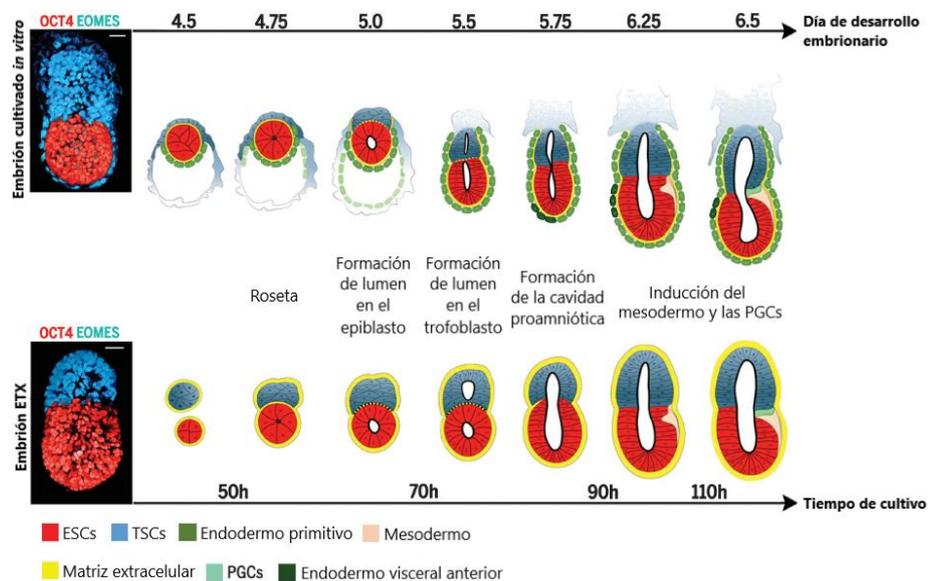


Figura 7. Comparación de los eventos, tiempos y tipos celulares de los embriones ETX respecto a embriones “naturales” de ratón. OCT4 = marcador del epiblasto. EOMES = marcador del trofoblasto (adaptado de 15).

Los cambios morfológicos de los ETX fueron equivalentes en espacio y tiempo a los ocurridos en embriones “naturales”, excepto por la ausencia de endodermo, al no detectar expresión del marcador *GATA4* (Figura 7), por lo que, aunque los resultados fueron mejores que los obtenidos por otros grupos que partieron únicamente de ESCs, todavía quedaba bastante que mejorar (15).

El anterior experimento demostró que se consiguen mejores resultados al combinar diferentes tipos de células troncales precursoras tanto de tejidos embrionarios como de extraembrionarios, quizás por la presencia de una señalización celular entre ellas que favorece un correcto desarrollo. Por ello, el mismo grupo utilizó esta estrategia en 2021, pero añadiendo un tipo celular más. Obtuvieron XENs inducidas (iXENs) a partir de ESCs, que combinaron con ESCs naïve y TSCs de ratón, creando **embriones ETX inducidos** o **iETX**. Para ello, insertaron el gen *GATA4* en ESCs, que determina la diferenciación al endodermo. Después, pusieron en contacto los tres tipos celulares en un medio de cultivo para tejidos y observaron que se agregaban y compactaban a las 48 h. A continuación, se elongaban, adquiriendo una forma que recordaba a la morfología de un embrión tras la implantación, al igual que en el anterior experimento (Figura 8A). Analizando su transcriptómica, demostraron que expresaban marcadores posimplantación: GATA6, GATA4 y SOX17 en las iXENs; EOMES, AP2 γ y CDX2 en las TSCs; OCT4 y OTX2 en las ESCs, y EOMES y OTX2 en las iXENs adyacentes a las ESCs. No obstante, a pesar de presentar un mejor perfil transcriptómico que los ETX y una mayor cantidad de células, solamente el 20% de los iETX tenían esta morfología en el cuarto día de cultivo embrionario. Además, únicamente se consiguieron cultivar hasta el día 6 y, en ocasiones, se observó una formación anómala del endodermo debido a fallos en la migración celular en la gastrulación. También es importante destacar que el perfil genético no se correspondía al 100% con el de embriones “naturales” en los mismos estadios, por lo que, como los autores indican, todavía quedaban detalles por mejorar (16).

Así lo hicieron en 2022, cuando consiguieron cultivarlos 8.5 días con la misma estrategia, excepto por que, en el día 7-8 de desarrollo, transfirieron los embriones iETX de ratón a un cultivo rico en glucosa en suspensión y en rotación para favorecer el contacto celular, momento en que se observó la **neurulación** o formación del cordón neural; la **somitogénesis** o formación de somitas; la **organogénesis** del cerebro, el corazón (con latido) y el intestino; la formación del **alantoides**, e, incluso, se identificaron **PGCs** expresando los marcadores *STELLA*, *SOX2* y *NANOG*, todo ello envuelto en una membrana semejante al **saco vitelino** (Figura 8B). En este segundo intento, el 21% de los iETX llegaron a día 5 y, de ellos, el 70% a día 8.5. Además, su morfología, tipos celulares, topografía celular en el tiempo, perfil de expresión génica y metabolismo eran muy parecidos a la de embriones “naturales” en los mismos estadios, pero la variabilidad del tamaño era mayor en los iETX. Además, los autores indican que será necesario continuar mejorando las condiciones de cultivo para poder mantenerlo más allá del día 8.5 y para conseguir un mejor desarrollo de los tejidos extraembrionarios (17).

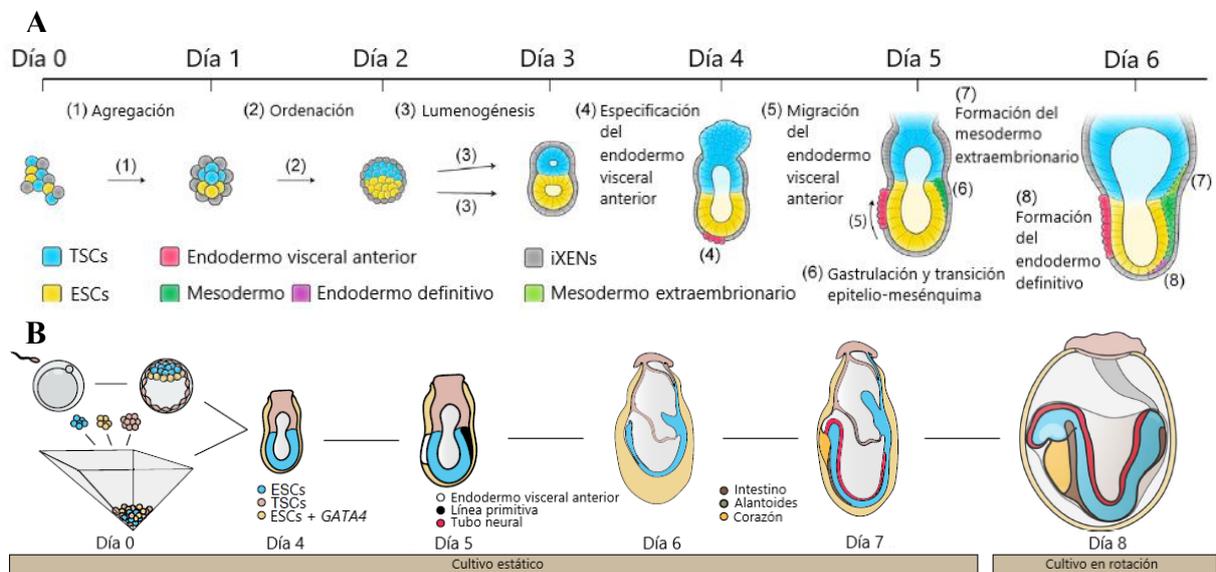


Figura 8. A. Primera estrategia: cultivo en suspensión de los iETX del día 0 al 6 (adaptado de 16). B. Segunda estrategia: cultivo en suspensión de los iETX del día 0 al día 7 y en rotación del día 7 al 8 (adaptado de 17).

De forma parecida y a la par, el grupo de Jacob Hanna desarrolló un sistema que combina un cultivo estático para la gastrulación y un cultivo en rotación para la organogénesis en 2021 con buenos resultados en embriones “naturales” de ratón. En este caso, las condiciones de cultivo estaban mucho más controladas y optimizadas para cada estadio, permitiendo a los embriones llegar hasta el día 11. De hecho, para el cultivo en rotación, desarrollaron un dispositivo capaz de regular: composición del medio y del aire y presión. En 2022, lo pusieron a prueba en embriones iETX de ratón en los que los tres tipos celulares se obtuvieron a partir de ESCs: ESCs expresando *GATA4* para conseguir iXENs, ESCs expresando *CDX2* en presencia de ácido lisofosfatídico (inhibidor de la vía de Hippo) para conseguir TSCs inducidas (iTSCs) y ESCs naïve que darían lugar al embrión. Los cultivaron durante tres días en un medio específico para la agregación celular, dos días en medio EUCM2 en un agitador y cuatro días en medio EUCM en el dispositivo creado en 2021, de manera que pudieron observar los procesos de **neurulación**, **somitogénesis** y **organogénesis** del cerebro, el corazón (con latido) y el intestino, de igual forma y en los mismos tiempos que el otro grupo. También desarrollaron el **alantoides**, el **amnios** y el **saco vitelino**, en donde se encontraron **células sanguíneas** en circulación. Además, en el día 5 (equivalente 6.5 en un embrión “natural”) se pudieron identificar **PGCs** expresando *BLIMP1* y *STELLA* y cuya migración tuvo lugar en el día 8 (equivalente al 8.5 “natural”). La morfología embrionaria y la localización y proporción celular eran muy similares al de embriones “naturales”, pero, como le ocurrió al otro grupo, la variabilidad en tamaño era mayor en los iETX. La principal desventaja fue que, de las agregaciones celulares iniciales, solamente el 0.1-0.5% llegaron a este estadio con una morfología correcta. No obstante, a pesar de que quedan detalles por mejorar, corroboraron que se puede partir de un solo tipo de célula

troncal para generar embriones artificiales parecidos a los “naturales”, lo cual abre la puerta a la investigación con iPSCs con el mismo propósito en un futuro (18).

En la actualidad, tanto el grupo de Zernicka-Goetz como el de Hanna tienen sendos artículos en proceso de revisión por pares en los que reportan los resultados obtenidos al aplicar estas técnicas creando **embriones artificiales humanos**.

4.3.4. Clonación doble de espermatozoides

Esta técnica ha surgido en los últimos años con el objetivo de obtener ESCs que derivar *in vitro* a otros tipos celulares en el campo de la medicina regenerativa. Consiste en la inyección de dos espermatozoides en el citoplasma de un ovocito enucleado. Tras la aparición de los dos pronúcleos, se comienza a dividir y es en el estadio de blastocisto donde se toma la MCI para obtener otros tipos celulares *in vitro* (19). Sin embargo, también se ha probado su uso en el campo de la mejora de la cría de ganado, con lo que podría llegar a convertirse en una alternativa en reproducción humana asistida para las parejas formadas por dos hombres que quieren ser padres genéticamente relacionados del mismo hijo. Este simplemente diferiría de ellos en el ADN mitocondrial, que sería heredado de la donante del ovocito.

Estos avances han sido posibles gracias a la experiencia previa en la haploidización y obtención de iPSCs de células somáticas. Sin embargo, los resultados conseguidos hasta ahora muestran una mejor reprogramación epigenética al inyectar dos espermatozoides que con el método original, el cual suele dar lugar a un borrado epigenético incompleto que lleva a una baja capacidad de diferenciación, de crecimiento, de expresión génica y de metilación del ADN. Además, el hecho de que en una fecundación natural pueda haber tres pronúcleos por polispermia es indicador de que el citoplasma del ovocito puede reprogramar dos núcleos masculinos a la vez. Tampoco se ha detectado ningún problema en la activación ovocitaria ni en la desmetilación del ADN, ya que lo realizan factores del espermatozoide. Esto no ocurre cuando se transfiere el núcleo de una célula somática, que necesita de una activación química o eléctrica. También se generan mejores oscilaciones de Ca^{++} y menos especies reactivas de oxígeno que en la partenogénesis. La inyección de dos espermatozoides favorece, además, a la regulación genética en el desarrollo embrionario temprano debido a la presencia de miARNs masculinos esenciales en esta etapa, que faltan al usar células somáticas y ovocitos (19).

En cuanto a la eficiencia de la técnica, algunos estudios han obtenido una tasa de éxito de llegada a blastocisto del 43% en ratones y del 31% en bovinos. Teniendo en cuenta que, escogiendo dos espermatozoides al azar, puede darse la combinación YY, que impide un desarrollo embrionario correcto, en la mejora de la cría de ganado se usa la citometría de flujo

para clasificar los espermatozoides según el cromosoma sexual y, así, poder combinarlos adecuadamente (19). Sin embargo, según la Ley 14/2006, en España no es legal la selección del sexo del embrión en medicina reproductiva humana (excepto en circunstancias muy concretas) (6), por lo que cabría esperar una menor tasa de éxito del tratamiento si en algún momento se llegase a aplicar en clínica. No obstante, este hipotético futuro se ve más lejano al tener en cuenta el principal obstáculo de la técnica: una metilación aberrante en los genes de impronta. Además, debería estudiarse si tiene lugar la inactivación de uno de los cromosomas en la descendencia XX. Quizás sean estas anomalías epigenéticas la razón por la que todavía no se ha conseguido el nacimiento de crías mediante la clonación doble de espermatozoides (19).

4.4. Cuestiones éticas y legales en la creación de gametos y embriones artificiales
Los científicos y bioéticos han tenido en consideración la ética detrás de estos nuevos procedimientos desde sus orígenes. Hub Zwart considera que recurrir a ellos cuando se es infértil va en contra de la naturaleza y que, por tanto, no está bien. Sin embargo, esta afirmación está sujeta a la falacia naturalista, que iguala lo natural a lo moral. Nadie cuestionaría que someterse a una cirugía para reparar o reemplazar un hueso roto es inmoral, a pesar de que incorporar piezas de metal a un cuerpo humano no se corresponda con la naturaleza del mismo. John Harris y Giuseppe Testa, al contrario, consideran que no hay problema, siempre y cuando los gametos y embriones artificiales sean más o menos parecidos a los “naturales”, con la única diferencia de ser producidos fuera del cuerpo humano (20).

Hoy en día, se tiende más a considerar estas nuevas tecnologías dentro de un **espectro**, planteado por Kate Soper, que abarca desde lo más natural hasta lo más artificial. Cuanta más intervención humana haya en un procedimiento, más hacia el lado “artificial” se encontrará. Por ejemplo, el cruce de plantas para la selección de caracteres de interés se encontraría más hacia el extremo “natural”, mientras que la obtención de cultivos modificados genéticamente estaría más cerca del extremo “artificial”. Sin embargo, no existen todavía indicaciones sobre cómo usar este espectro (20). Una reflexión que podría ayudar a su abordaje es la planteada por David Oderberg, que considera que creando gametos y embriones artificiales no se está creando vida, puesto que no se parte de materia inorgánica para formar nuevas células u organismos. Simplemente se manipula la materia viva ya existente. Por lo tanto, los gametos y embriones artificiales no son 100% artificiales, pero despiertan cuestiones éticas que los organismos naturales no, incluso aunque llegasen a ser funcionalmente iguales a ellos (21). Además, su clasificación en este espectro debería depender de la técnica utilizada. Por ejemplo, no es lo mismo obtener espermatozoides mediante la maduración *in vitro* de espermatogonias que a partir de iPSCs, donde hay más intervención humana.

Hay que tener en consideración que, cuando la biotecnología proporciona un control sobre algo que antes no se controlaba, el individuo tiene el deber de responder por ello. Así, el usar gametos y embriones artificiales se han convertido en una opción más para ser padres y decidir usarlos supone asumir la **responsabilidad moral** de tener el control sobre los materiales que darán lugar a un nuevo ser humano (Smajdor et al., 2018). Además, esto lleva a otra cuestión: ¿estas técnicas deberían ser una opción más para todo el público general o solo deberían de estar disponibles para personas con infertilidad, solteras y LGTBIQ+? (21)

Un problema añadido que surge de estas tecnologías es una creación de un **exceso de embriones** de los cuales solo los “mejores” serían seleccionados para la transferencia. ¿Esto supondría destruir más cantidad de embriones viables que en la reproducción asistida “tradicional” debido a la baja tasa de éxito de estas nuevas técnicas? (21)

Yendo más allá, la creación de gametos y embriones artificiales podría incluir la modificación genética algún día (21), lo cual cambia tanto la relación del ser humano con los gametos y embriones como con su descendencia, puesto que los padres podrían convertirse en “diseñadores” de sus hijos (20). Además, siguiendo con el dilema planteado antes, si estos procedimientos solo estuviesen disponibles para una parte concreta de la población ¿sería justo que solo ellos pudieran mejorar genéticamente sus gametos o embriones? Si estuviese disponible para el público general, ¿habría una desigualdad social porque solo las personas con mayores ingresos podrían permitirse la edición genética de sus gametos o embriones?

Los problemas persisten al analizar la regulación actual de estos procedimientos. La **legislación** que regula la obtención de gametos artificiales a partir de células troncales humanas varía según el país y dentro del mismo territorio también pueden existir incoherencias. Por ejemplo, en el Reino Unido, la Autoridad para la Fecundación Humana y la Embriología insiste en que la obtención de gametos artificiales es de alta prioridad, mientras que la legislación del país prohíbe su uso en clínica. Algo parecido ocurre en Japón, donde la legislación permite derivar ESCs humanas a gametos, pero prohíbe su fecundación. Por otro lado, países como Estados Unidos presentan una dificultad añadida, ya que las leyes varían en cada Estado. Es necesario destacar que ya existe una guía de uso de ESCs humanas, redactada por la Sociedad Internacional para la Investigación con Células Troncales, cuya intención es regular su uso de forma global. Aun así, la legislación en este tema todavía es escasa y difusa en muchos países (21). Se hace necesario un acuerdo entre las autoridades para regular estos asuntos, siguiendo las recomendaciones de profesionales en la materia.

También se necesita una regulación más específica respecto a la utilización de gametos y embriones artificiales con fines de investigación, puesto que se plantea el dilema de si se respeta la **libertad reproductiva**. Los gametos artificiales humanos obtenidos a partir de células de donantes podrían ser fecundados en laboratorios, obteniendo embriones que, a su vez, producirían células precursoras de gametos (20). Además, podrían derivarse de tejido fetal, de niños y/o fallecidos (21), hechos muy específicos que también deben someterse a regulación.

Otro de los principales debates en este campo es si a los embriones artificiales se les deberían de aplicar las mismas consideraciones éticas y legales que a los “naturales”. De ser así, existiría otro problema: la **definición de “embrión”** varía según el país y, en consecuencia, las leyes que lo amparan. Por ejemplo, en España, legalmente, un embrión es aquello obtenido tras fecundar un ovocito con un espermatozoide. En Países Bajos y Bélgica, se considera embrión cualquier célula o conjunto de células que pueda desarrollarse dando lugar a un humano, independientemente de cómo fue creado. La Unión Europea, en el Caso C-34/10 de 2011, consideró como embrión a cualquier óvulo fecundado que inicie el desarrollo de un ser humano, lo cual incluiría al trasplante del núcleo de una célula somática a un ovocito enucleado y a la partenogénesis. En el Caso C-364/13 de 2014, modificó esta definición, dando el estatus de embrión a cualquier óvulo que tenga la capacidad de dar lugar a un ser humano de forma equivalente a un ovocito fecundado por un espermatozoide, independientemente de la técnica aplicada (22). Estas discrepancias denotan la necesidad de llegar primero a un consenso a nivel mundial acerca de lo que es un embrión para poder decidir si los embriones artificiales se comportan como tales y, en consecuencia, habría que aplicarles las mismas normas y restricciones que a los “naturales”. En caso afirmativo, se iniciarían, además, nuevos debates, como ¿debería de prohibirse la destrucción de embriones artificiales una vez se haya comenzado a desarrollar el sistema nervioso, al igual que se prohíbe el aborto voluntario a partir de este momento en la mayoría de países donde esta práctica es legal? (22) ¿Debería de aplicarse la restricción de cultivo embrionario hasta el día 14 en embriones artificiales tal y como la Ley 14/2006 establece para embriones “naturales” en España? (6)

Yendo más allá, si en un futuro se desarrollasen úteros artificiales capaces de llevar una gestación a término fuera del cuerpo humano, ¿a quién correspondería la maternidad y paternidad del bebé? ¿A quien haya aportado el material genético? ¿Y si fuese donado? En España, se atribuye la maternidad a la mujer que da a luz al bebé, independientemente de su genética. Sin embargo, esto varía en otros lugares. Por lo tanto, si todavía dichos temas son fuente de debate para un desarrollo intrauterino, ¿está el ser humano social, moral y legalmente preparado para un desarrollo embrionario completo fuera del útero materno? (22)

5. Argumentación crítica

El principal impedimento de las técnicas abordadas es el establecimiento de una epigenética aberrante, que podría afectar a la funcionalidad de los gametos y embriones y a futuras generaciones. Dado que todavía no se ha conseguido descifrar todo el epigenoma humano, ¿tiene sentido la aplicación de estas técnicas en clínica? Debería de priorizarse el investigar el campo de la epigenómica primero, ya que, hoy en día, no se puede asegurar al 100% que la descendencia obtenida con gametos artificiales sea “normal”.

Siguiendo con este razonamiento, ¿tiene sentido derivar ESCs e iPSCs a gametos sin conocer los mecanismos moleculares que rigen la diferenciación *in vivo* de estos y su epigenética? Además, previo a ello, se necesita reprogramar las células somáticas mediante modificaciones genéticas en las que se usan virus. Es necesario actuar con cautela por las consecuencias que esto podría tener también en el recién nacido y en futuras generaciones.

En cambio, el uso de estas técnicas en investigación podría ser muy útil para estudiar los cambios epigenéticos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario, por ejemplo, contribuyendo a la obtención de conocimiento para que algún día puedan aplicarse en clínica.

Por otro lado, se debería priorizar el llegar a acuerdos internacionales sobre cuáles son las diferencias entre un gameto o embrión “natural” y uno artificial y el cómo usarlos en clínica y en investigación, antes de que algún grupo llegue a límites inmorales debido a vacíos legales.

En definitiva, este campo genera muchas más preguntas que respuestas hoy en día. Tiene sentido afrontarlas y resolverlas en investigación, pero ¿es realmente una necesidad en clínica, existiendo la donación de gametos y embriones, que cada vez está más regulada, y dado que la carencia total de gametos es la causa de infertilidad de una mínima parte de la población? Quizás tendría más sentido el invertir más recursos en la maduración *in vitro* de células precursoras, que permitiría a los pacientes contar con algún o más gametos que usar en sus ciclos de reproducción asistida, aumentando las probabilidades de ser padres.

6. Conclusiones

La historia de los gametos artificiales comenzó en la década de los 90. Mediante la maduración *in vitro* de células precursoras, hasta la actualidad, se ha conseguido llegar al estadio de ovocitos MII, pero no de espermatozoides, en modelos 3D. Se han obtenido espermátidas con un comienzo de cola y, aunque existe literatura que demuestra cierto éxito en su uso, no se puede descartar que no haya consecuencias epigenéticas por su falta de maduración o por los largos

tiempos de cultivo. El principal obstáculo es el amplio desconocimiento sobre los mecanismos moleculares que rigen la diferenciación celular, lo que dificulta replicarla *in vitro*.

La haploidización es una técnica que se utilizó en los 2000 para obtener gametos a partir de células somáticas del paciente. Sin embargo, se ha demostrado que da lugar a aneuploidías y descendencia con fenotipo anormal en animales, por lo que se prohibió aplicarla en humanos. Al contrario, su uso para la maduración de células precursoras de gametos ha dado lugar a descendencia sana, aunque tampoco permite completar la espermiogénesis.

Las únicas técnicas que han conseguido formar gametos a partir de células somáticas son la creación de embriones a partir de células del paciente para derivar sus ESCs a gametos y la producción de iPSCs con células del paciente para diferenciarlas *in vitro*. Desde los 2000, se han probado distintas estrategias de cultivo y modificaciones genéticas y el mejor escenario también ha sido la recreación del ambiente gonadal, consiguiéndose espermátidas con comienzo de cola y ovocitos MII. En algunos casos, se obtuvo descendencia sana, pero tampoco se pueden descartar consecuencias epigenéticas.

Algunas estrategias recientes que podrían beneficiar a parejas homosexuales y personas solteras son: la obtención de ovocitos a partir de iPSCs masculinas, la partenogénesis y la clonación doble de espermatozoides. Sin embargo, todas ellas necesitan solventar el principal problema de la falta de un gameto: una impronta aberrante, que podría afectar al desarrollo del embrión, al de los tejidos extraembrionarios y a las futuras generaciones. Para ello, haría falta realizar modificaciones genéticas, lo cual dificulta que puedan aplicarse en humanos algún día.

Por otro lado, la historia de los embriones artificiales es más reciente. A pesar de que desde los 80 hasta la actualidad se ha trabajado con blastoides, embrioides y gastruloides, las investigaciones de los últimos años con blastoides y, sobre todo, en las que se combinan ESCs, TSCs y XENs “naturales” o inducidas, son mucho más prometedoras, pues permiten una recreación espacio-temporal y de la topografía celular mucho más fiel a la realidad. Con esta última estrategia, se ha conseguido cultivar embriones artificiales de ratón *in vitro* hasta el día 8.5, observándose el comienzo de la organogénesis. La clave ha sido optimizar las condiciones de cultivo y pasar de un cultivo estático a uno en rotación a partir del día 7.

No obstante, la legislación que regula la creación, destrucción y uso de gametos y embriones artificiales, así como la que establece su definición, es todavía escasa y difusa en muchos países y no existe un consenso internacional. Se hace urgente la convocatoria de un comité para llegar a acuerdos y establecer límites legales, tanto en su uso en reproducción asistida como en investigación, antes de que se siga avanzando en estos campos.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. (4 de abril de 2023). *La OMS alerta de que una de cada seis personas padece esterilidad*. <https://www.who.int/es/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility>
2. Oqani, R. K., So, S., Lee, Y., Ko, J. J., & Kang, E. (2022). Artificial Oocyte: Development and Potential Application. *Cells*, 11. <https://doi.org/10.3390/cells11071135>
3. Moreno, I., Míguez-Forjan, J. M., & Simón, C. (2015). Artificial gametes from stem cells. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 42(2), 33-44. <https://doi.org/10.5653/cerm.2015.42.2.33>
4. Zhang, P.-Y., Fan, Y., Tan, T., & Yu, Y. (2020). Generation of Artificial Gamete and Embryo From Stem Cells in Reproductive Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00781>
5. Tesarik, J., Mendoza, C., & Mendoza-Tesarik, R. (2021). Human artificial oocytes from patients' somatic cells: past, present and future. *Reproduction and Fertility*, 1, H1-H8. <https://doi.org/10.1530/RAF-20-0039>
6. Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. *Boletín Oficial del Estado*, 126, de 27 de mayo de 2006.
7. Manku, G., & Culty, M. (2015). Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: Recent advances and remaining challenges. *Reproduction*, 149, R139–R157. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0431>
8. Nagy, Z. P., & Chang, C.-C. (2007). Artificial gametes. *Theriogenology* 67, 67, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.013>
9. Cui, Y.-H., Chen, W., Wu, S., Wan, C.-L., & He, Z. (2023). Generation of male germ cells in vitro from the stem cells. *Asian Journal of Andrology*, 25, 13-20. <https://doi.org/10.4103/aja20226>
10. Yuan, Y., Li, L., Cheng, Q., Diao, F., Zeng, Q., Yang, X., Wu, Y., Zhang, H., Huang, M., Chen, J., Zhou, Q., Zhu, Y., Hua, R., Tian, J., Wang, X., Zhou, Z., Hao, J., Yu, J., Hua, D., ... Sha, J. (2020). In vitro testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids. *Cell Research*, 30, 244-255. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0283-z>
11. Nagy, Z. P., & Chang, C.-C. (2005). Current advances in artificial gametes. *Reproductive BioMedicine Online*, 11(3), 332-339. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60841-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60841-3)
12. Murakami, K., Hamazaki, N., Hamada, N., Nagamatsu, G., Okamoto, I., Ohta, H.,

- Nosaka, Y., Ishikura, Y., Kitajima, T. S., Semba, Y., Kunisaki, Y., Arai, F., Akashi, K., Saitou, M., Kato, K., & Hayashi, K. (2023). Generation of functional oocytes from male mice in vitro. *Nature*, *615*, 900-906. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05834-x>
13. Bos-Mikich, A., Bressan, F. F., Ruggeri, R. R., Watanabe, Y., & Meirelles, F. V. (2016). Parthenogenesis and Human Assisted Reproduction. *Stem Cells International*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/1970843>
14. Li, R., Zhong, C., Yu, Y., Liu, H., Sakurai, M., Yu, L., Min, Z., Shi, L., Wei, Y., Takahashi, Y., Liao, H.-K., Qiao, J., Deng, H., Nuñez-Delicado, E., Rodriguez Esteban, C., Wu, J., & Izpisua Belmonte, J. C. (2019). Generation of Blastocyst-like Structures from Mouse Embryonic and Adult Cell Cultures. *Cell*, *179*, 687-702. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.029>
15. Harrison, S. E., Sozen, B., Christodoulou, N., Kyprianou, C., & Zernicka-Goetz, M. (2017). Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science*, *356*. <https://doi.org/10.1126/science.aal1810>
16. Amadei, G., Lau, K. Y. C., De Jonghe, J., Gantner, C. W., Sozen, B., Chan, C., Zhu, M., Kyprianou, C., Hollfelder, F., & Zernicka-Goetz, M. (2021). Inducible Stem-Cell-Derived Embryos Capture Mouse Morphogenetic Events In Vitro. *Developmental Cell*, *56*, 366-382. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.12.004>
17. Amadei, G., Handford, C. E., Qiu, C., De Jonghe, J., Greenfeld, H., Tran, M., Martin, B. K., Chen, D.-Y., Aguilera-Castrejon, A., Hanna, J. H., Elowitz, M. B., Hollfelder, F., Shendure, J., Glover, D. M., & Zernicka-Goetz, M. (2022). Embryo model completes gastrulation to neurulation and organogenesis. *Nature*, *610*, 143-153. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05246-3>
18. Tarazi, S., Aguilera-Castrejon, A., Joubran, C., Ghanem, N., Ashouokhi, S., Roncato, F., Wildschutz, E., Haddad, M., Oldak, B., Gomez-Cesar, E., Livnat, N., Viuknov, S., Lokshantov, D., Naveh-Tassa, S., Rose, M., Hanna, S., Raanan, C., Brenner, O., Kedmi, M., ... Hanna, J. H. (2022). Post-gastrulation synthetic embryos generated ex utero from mouse naive ESCs. *Cell*, *185*, 3290-3306. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.07.028>
19. Zhang, Z., Zhang, J., Huang, S., He, X., & Deng, L. (2020). Double sperm cloning (DSC) is a promising strategy in mammalian genetic engineering and stem cell research. *Stem Cell Research & Therapy*, *11*. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01907-0>
20. Smajdor, A., Cutas, D., & Takala, T. (2018). Artificial gametes, the unnatural and the artefactual. *Journal of Medical Ethics*, *0*, 1-5. <https://doi.org/10.1136/medethics-2017->

[104351](#)

21. Kashir, J., Jones, C., Child, T., Williams, S. A., & Coward, K. (2012). Minireview
Viability Assessment for Artificial Gametes: The Need for Biomarkers of Functional.
Biology of Reproduction, 87(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.103853>
22. Villalba, A., Rueda, J., & de Miguel Beriain, Í. (2023). Synthetic embryos: a new
venue in ethical research. *Reproduction*, 165(4), 1470–1626.
<https://doi.org/10.1530/REP-22-0416>