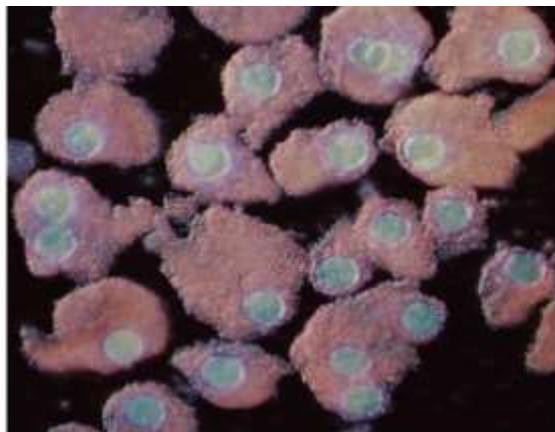

TRABAJO FIN DE MÁSTER
EN
BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA APLICADA A LA
REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

Células madre e infertilidad



Autor: Ana Moreno Jiménez

Tutor: Beatriz Amorocho Llanos

Villaviciosa de Odón, 3 de septiembre de 2021

Índice

Resumen.....	2
Abstract.....	3
1. Introducción.....	4
2. Métodos.....	8
2.1 Búsqueda bibliográfica.....	8
2.2 Consideraciones éticas.....	8
3. Resultados.....	9
3.1 Estrategias para infertilidad femenina.....	10
3.1.1 Células madre derivadas de la médula ósea (BMDSCs).....	10
3.1.2 Plasma rico en plaquetas (PRP).....	17
3.1.3 Células madre mesenquimales (MSCs).....	19
3.2 Estrategias para infertilidad masculina.....	20
3.2.1 Células madre espermatozonales (SSCs).....	20
3.2.2 Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).....	21
3.3 Gametogénesis <i>in vitro</i>	24
3.3.1 Diferenciación a gametos femeninos.....	24
3.3.2 Diferenciación a gametos masculinos.....	25
4. Discusión de los resultados.....	27
4.1 Estrategias para infertilidad femenina.....	27
4.2 Estrategias para infertilidad masculina.....	32
4.3 Gametogénesis <i>in vitro</i>	32
5. Conclusiones.....	33
6. Bibliografía	33

Resumen

La infertilidad es un problema de salud mundial en la que personas en edad reproductiva con deseos emocionales de ser padres son incapaces de lograr un recién nacido vivo (RNV), generando frustración y malestar. Los tratamientos de reproducción asistida (TRA) han ayudado a miles de personas a conseguir dicho objetivo. Desafortunadamente, sigue habiendo determinados pacientes que no consiguen descendencia genéticamente propia a través de TRA, y por ello la necesidad de generar nuevos enfoques clínicos. El objetivo de la comunidad científica es la búsqueda de terapias no invasivas, eficientes y seguras que permita recuperar la fertilidad de pacientes con POI (*del inglés, poor ovarian insufficence*), endometriosis, azoospermia, hipogonadismo masculino, etc. Las células madre han abierto nuevas vías de investigación en este campo. El rejuvenecimiento ovárico mediante la infusión ovárica con células madre derivadas de la médula ósea (*BMDSCs, del inglés bone marrow derivated stem cells*), células madre mesenquimales (*MSCs, del inglés mesechymal stem cells*) y plasma rico en plaquetas (PRP) han demostrado restaurar la fertilidad femenina, logrando hasta RNV después de este tipo de prácticas. Además, para la infertilidad masculina el empleo de terapias con células madre espermatogoniales es un enfoque muy prometedor en el futuro, ya que se ha conseguido crías de ratones fértiles mediante la inducción de la espermatogénesis en ratones sin espermatozoides. Otra de las estrategias es la utilización de las iPSCs (*del inglés Induced Pluripotent Stem Cells*), a partir de la cual se puede inducir la diferenciación a múltiples tipos celulares como gametos femeninos o masculinos, brindando la oportunidad de producir gametos funcionales a aquellos pacientes que no los tienen. Para el hipogonadismo masculino se busca una terapia innovadora para reemplazar a la terapia hormonal que existe actualmente.

El objetivo de este trabajo es la recopilación de las emergentes estrategias con células madre para restaurar / preservar la fertilidad femenina y masculina.

Abstract

Infertility is a global health problem in which people of reproductive age with emotional desires to be parents are unable to achieve a live newborn, generating frustration and discomfort. Assisted reproductive treatments (ART) have helped thousands of people achieve this goal. Unfortunately, there are still certain patients who do not obtain genetically their own offspring through ART, therefore the need to generate new clinical approaches. The objective of the scientific community is the search for non-invasive, efficient and safe therapies for patients with POI (poor ovarian insufficiency), endometriosis, azoospermia, male hypogonadism, etc. Stem cells have opened up areas for further research in this field. Ovarian rejuvenation using ovarian infusion with bone marrow derived stem cells (BMDSCs), mesenchymal stem cells (MSCs), and platelet-rich plasma (PRP) have been shown to restore female fertility, achieving even a live newborn after this type of practice. In addition, for male infertility, the use of spermatogonial stem cell therapies is a very promising approach in the future, since fertile mouse offspring have been obtained from the induction of spermatogenesis in mice without sperm. Another strategy is the use of iPSCs (Induced Pluripotent Stem Cells), from which differentiation can be induced to multiple cell types such as female or male gametes, providing the opportunity to produce functional gametes to those patients who do not have it. For male hypogonadism, an innovative therapy is being sought to replace the hormonal therapy that currently exists.

The objective of this work is the compilation of emerging strategies with stem cells to restore / preserve female and male fertility.

1. Introducción

Las células madre se caracterizan por presentar una gran capacidad de autorrenovación, pudiendo mantener un estado indeterminado o entrar en un programa de diferenciación a distintos tipos celulares de forma irreversible con una función más especializada [1]. Estas células las podemos encontrar tanto en la etapa embrionaria, fetal como en la etapa adulta, de ahí que haya distintos tipos de células madre que presentan características diferentes en cuanto a potencialidad y origen.

Las células madre más importantes y con un mayor potencial de autorrenovación y proliferación son las **células madre embrionarias humanas** (*hESCs*, del inglés *human embryonic stem cells*), y las **células madre pluripotentes inducidas** (*iPSCs*, del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*). Las células madre embrionarias humanas se obtienen a partir de la masa celular interna (*ICM*, del inglés *inner cell mass*). El estadio de blastocisto se corresponde con una etapa embrionaria preimplantacional que ocurre entre 5º y 7º día después de la fecundación. Éste presenta 2 capas celulares, el trofoectodermo que dará lugar a los tejidos extraembrionarios como la placenta y la masa celular interna, la que formará el embrión. Las células de la ICM son pluripotentes, ya que se pueden diferenciar en cualquiera de las 3 capas germinales primarias (ectodermo, endodermo y mesodermo), a partir de las cuales se formarán todos los tejidos y órganos. Hay diversos métodos para derivar las *hESCs* que consisten en la separación del trofoblasto y ICM en su mayoría. Dicha separación puede hacerse mediante inmunocirugía, manipulación mecánica o láser, entre otros. Una vez obtenida la ICM, es transferida a una placa de cultivo bajo condiciones específicas para su correcto crecimiento y proliferación *in vitro* [1].

La embriogénesis es un proceso complejo en el que se desarrolla el embrión durante las primeras semanas de gestación. Consta de varias etapas desde la fecundación de los gametos y la consecuente formación del cigoto, donde éste comienza a segmentarse mediante divisiones mitóticas formando el embrión. Hasta entonces el embrión pasa por una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos siendo aproximadamente a la segunda semana de gestación donde comienza la organogénesis con la formación de las 3 capas germinales embrionarias, a partir de las cuales se formarán los tejidos y órganos adultos. Dicho proceso va acompañado de una pérdida progresiva de la capacidad pluripotente. De ahí que solo podamos encontrar células totipotentes en el cigoto durante las primeras divisiones mitóticas.

Otro tipo de células madre son las **células madre adultas** o células madre somáticas (*ASCs, del inglés adults stem cells,*) que se encuentra en áreas denominadas nichos dentro de los tejidos y órganos. Entre ellos se encuentran la médula ósea, la piel, sangre periférica, músculo esquelético, tejido adiposo, endometrio, testículo, intestino, hígado, etc. Estas células permiten la renovación o regeneración de tejido cuando éste sufre algún daño o enfermedad, así como para mantener los niveles celulares basales [1]. ASCs son una población de células que se mantienen en un estado pre-diferenciado, y que solo podrán dar lugar a células de un solo linaje embrionario dependiendo del tejido donde se encuentre, es decir, son células multipotentes. Sin embargo, a partir de éstas se pueden obtener células pluripotentes capaces de diferenciarse en cualquiera de los 3 linajes embrionarios, a través de un proceso denominado reprogramación genética, produciendo así las **células madre pluripotentes inducidas**, mencionadas anteriormente.

Para obtener las iPSCs se debe realizar la sobreexpresión de un conjunto de factores de transcripción que han demostrado ser indispensables para la reprogramación de células somáticas a células madres pluripotentes. Esos factores de transcripción son OCT4 (octámero de unión a factor de transcripción 4), SOX2 (*del inglés, Sex determining Region Y-box 2*), c-MYC (pertenece a la familia protooncogén MYC), KLF4 (*del inglés, Kruppel-like factor 4*) y Nanog (proteína homeobox), que mantienen la pluripotencia de las células y suprimen la determinación celular [1,2]. Además, necesitan unas condiciones de cultivo específicas para mantener ese estado indiferenciado. Estas células producidas mediante manipulación genética son muy similares a las células madre embrionarias humanas en cuanto a morfología, proliferación, antígenos de superficie, expresión génica, estado epigenético y además poseen una alta actividad telomerasa, característica de células pluripotentes.

Hay una gran variedad de células madres adultas dependiendo del tejido de donde se obtengan, pero las más reconocidas son las **Células madre mesenquimales** (*MSCs, del inglés Mesenchymal stem cells*). Éstas se pueden derivar a partir de la médula ósea, tejido adiposo, hueso, sangre periférica, de la gelatina de Wharton del tejido del cordón umbilical, etc. MSC son capaces de diferenciarse en células del tejido mesodérmico como son las células musculares, cartílago, tejido adiposo y hueso [3]. Aunque se ha demostrado que ciertas células madres adultas a pesar de ser multipotentes pueden dar lugar a células pertenecientes a otra capa germinal distinta de donde se encuentra. Esta característica se denomina plasticidad y puede deberse a diversos factores, siendo uno de los más apoyados la transdiferenciación, es decir, la pérdida de marcadores específicos de tejido y la consecuente reprogramación nuclear

tanto genéticamente como a nivel epigenético. Un ejemplo de ello es la diferenciación de células madre mesenquimales en tejido neuronal, el cual pertenece a la línea germinal ectodérmica y no mesodérmica [3].

El potencial de estas células ha abierto nuevas vías de investigación en la medicina, brindando la oportunidad de desarrollar estrategias terapéuticas más novedosas para aquellas enfermedades humanas degenerativas o problemas reproductivos que aún no se han podido resolver hasta el momento. Además, también han contribuido en un mejor entendimiento en la biología celular y en el desarrollo embrionario. Cada una de ellas poseen características distintas y por tanto tienen fines variables. Hasta ahora se han realizado numerosos estudios con células madre sobre todo en modelos animales que inician prometedoras vías de investigación.

Lo que nos lleva a plantearnos una serie de cuestiones: ¿Sería posible tratar la infertilidad masculina o femenina con células madre?; ¿La producción de gametos *in vitro* podría conseguir descendencia genética propia del paciente sin tener que recurrir a la donación de gametos?

La infertilidad es un problema de salud mundial que se conoce como la incapacidad de lograr gestaciones capaces de evolucionar hasta la viabilidad fetal después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección, según la sociedad española de fertilidad (SEF). Es una enfermedad multifactorial, ya que puede deberse por diversas causas. Hay que tener en cuenta y considerar los diferentes factores que puedan afectar al paciente en su tratamiento de reproducción asistida (RA) y para ello, la etiología de la infertilidad, la edad, la situación socioeconómica, psicológica y física, la condición de salud que se encuentre el paciente, si toma determinados fármacos, la dieta, etc, pueden contribuir a los resultados del TRA o a la enfermedad en sí. Actualmente, más del 15% de las parejas presentan problemas de infertilidad en edad reproductiva donde los varones comprometen el 30% de los casos y la infertilidad femenina afecta a casi al 40% de las parejas. Aunque la infertilidad también puede ser mixta y ambos miembros de la pareja contribuyen a la dificultad de conseguir un RNIV [3].

La infertilidad y los problemas reproductivos han ido aumentando a lo largo de los años por cambios socioculturales. Uno de los cambios que más incidencia ha tenido es la postergación de la maternidad hasta edades más avanzadas, hecho que cobra relevancia, ya que conlleva una serie de efectos negativos sobre las células germinales, sobre todo, en los ovocitos y en la

reserva ovárica. Las disfunciones ováricas más comunes en mujeres menores de 40 años, que siguen en edad reproductiva son POI, endometriosis, síndrome ovario poliquístico, entre otras [4].

Las causas de la infertilidad masculina severa como la azoospermia, oligozoospermia y disfunción testicular pueden ser genéticas, médicas o ambientales [5]. Actualmente existe distintas estrategias en TRA para paliar la infertilidad masculina como son FIV (fecundación *in vitro*), ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoide), donación de gametos masculinos, terapia hormonal, dependiendo del tipo de infertilidad que padezca. Teniendo en cuenta el alto porcentaje de RNV en España debido al uso de tecnologías de RA, se siguen teniendo limitaciones para determinados tipos de pacientes que no lo consiguen, por lo que hay que estar en constante investigación para seguir entendiendo los factores que contribuyen a esta enfermedad mencionados anteriormente. El enfoque en terapias con células madre puede resultar la solución de muchos de esos pacientes.

Hasta ahora se han empleado diferentes tipos de células madre en investigaciones preclínicas y clínicas, desde las células madre pluripotentes inducidas para la generación de gametos *in vitro*, hasta células madre de la médula ósea para la restauración de la reserva ovárica en pacientes con ésta disminuida. La mayoría son ensayos preclínicos en modelos animales pero que tienen resultados muy prometedores no solo por los enfoques clínicos que proporciona sino por el mejor entendimiento en el desarrollo molecular de las células germinales humanas. De esta forma se le brinda la oportunidad de obtener descendencia genéticamente propia y viable gracias a un tratamiento que implicaría la utilización de las células madre.

En este trabajo de fin de máster discutiremos los diferentes estudios publicados recientemente y los avances de este tipo de tratamiento para la infertilidad y en la situación que se encuentra actualmente.

Objetivos

Revisar los últimos avances científicos de células madre con respecto a la infertilidad y la medicina reproductiva.

Exponer los beneficios y las limitaciones que presentan actualmente, enfocándonos principalmente en 3 aspectos:

- Rejuvenecimiento ovárico
- Tratamientos para la infertilidad masculina.

-Gametogénesis *in vitro*

2. Métodos

2.1 Búsqueda bibliográfica

Para la realización de este trabajo se ha elaborado una estrategia de búsqueda bibliográfica para la recopilación de los artículos científicos más relevantes sobre el tema en cuestión, células madre e infertilidad.

En base a las preguntas de investigación y el objetivo del trabajo se han utilizado unas determinadas palabras claves, que son las siguientes: *stem cells, infertility, ovarian rejuvenation, gametogenesis in vitro, male infertility, iPSCs, spermatogonial stem cells, poor ovarian insufficence*.

Para la búsqueda de los artículos se ha utilizado el idioma inglés, ya que es el principal idioma en el que se publican los artículos científicos. Además, de emplear los términos MeSH (*del inglés, Medical Subject Headings*) que aumenta la eficacia de estrategia de búsqueda. Para conocer los términos MeSH del tesoro se ha consultado Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) que nos proporciona el término en cuestión en inglés y a su vez en la forma documental. La base de datos empleada para la búsqueda de la información ha sido pubmed.

Se ha acotado los años de publicaciones científicas, para obtener información sobre los últimos avances respecto a años anteriores concretamente desde 2017 hasta 2021.

2.2 Consideraciones éticas

Toda nueva línea de investigación experimental en la que se utilice material biológico, suscita una serie de preocupaciones éticas y de seguridad, que hay que tener en cuenta. Actualmente existe una multitud de opiniones sobre si es válido o no la aplicación clínica de células madre, aunque los resultados que se hayan ido obteniendo de los estudios clínicos apunten a un enorme potencial terapéutico tanto en trastornos degenerativos, autoinmunes y genéticos. Dependiendo del tipo de célula madre que se utilice involucra un dilema ético diferente. En el caso de las células madres embrionarias humanas, la pregunta fundamental que se plantean en la comunidad científica es si moralmente es aceptable la destrucción de un embrión humano para obtener terapias y curar enfermedades. De ahí que el desarrollo de terapias clínicas basadas en estas células se haya ralentizado. Al ser un tema muy controvertido no se ha podido llegar a una ley universal, sino que cada país tiene una determinada legislación con respecto a la investigación con hESCs y por ello la mayoría de los estudios se han hecho en

modelos animales. La investigación con estas células nos aportará un mejor entendimiento del desarrollo humano y terapias basadas en el reemplazo celular en enfermedades humanas. La pluripotencia de estas células, a pesar de ser una gran ventaja porque se pueden diferenciar en células de las 3 capas germinales, igualmente pueden ser perjudiciales, ya que son muy difíciles de controlar en un trasplante *in vivo*, pudiendo dar lugar a la formación de tumores debido a una proliferación incontrolada. Por lo que es necesario más ensayos clínicos para poder obtener pruebas de seguridad y eficacia de la terapia basada en células madre embrionarias en el campo de la RA.

Las células madre pluripotentes inducidas también genera un dilema ético, pero están por encima moralmente de las hESCs, debido a que no es necesario la destrucción de un embrión humano para obtener el fin. En este caso se obtienen células somáticas de un adulto y se reprograman genéticamente para obtener células pluripotentes, con características similares a las hESCs. Además, abren una nueva vía de investigación como es la medicina personalizada, es decir, específica de cada paciente, donde no hay riesgo de rechazo inmunológico, ya que son células genéticamente específicas de cada individuo. La controversia ética y de seguridad que genera este tipo de células es que pueden ser genéticamente inestables y pueden causar anomalías genéticas y epigenéticas, por lo que sería necesario nuevas estrategias que aumenten la seguridad de reprogramación celular. A partir de estas células se pueden generar gametos masculinos y femeninos humanos, lo que conlleva una serie de preocupaciones éticas relacionadas con la explotación de la creación de embriones, cambios en la reproducción natural, incluida la posibilidad de derivar gametos para la reproducción del mismo sexo, así como en la reproducción asexual. Por último, las células madre mesenquimales que presentan capacidad inmunomoduladoras se utilizan para terapias celulares en enfermedades inmunológicas e inflamatorias crónicas. Pero también se ha visto que puede generar una diferenciación celular no deseada, así como la supresión de la respuesta inmune antitumoral provocando tumores y metástasis. Es necesario realizar unos protocolos de diferenciación celular optimizados para tener más pureza en los resultados. Futuras investigaciones en este campo tendrán que resolver las diferentes cuestiones gubernamentales, sociales y científicas para la aprobación y permiso de la aplicación de este tipo de células debido a su alto potencial [6].

3. Resultados

En este apartado se expondrá las diferentes estrategias que han ido emergiendo para la preservación de la fertilidad de pacientes que presentaban limitaciones para conseguirla.

3.1 Estrategias para infertilidad femenina

Todos los artículos incluidos en la búsqueda bibliográfica tienen en común un objetivo central: El rejuvenecimiento ovárico. Como ya sabemos el envejecimiento ovárico es un proceso fisiológico natural que va acompañado con la edad. En ocasiones este deterioro se puede producir de forma temprana, lo que se conoce como insuficiencia ovárica prematura (POI, *del inglés poor ovarian insufficence*) o menopausia prematura. Esta afectación la padecen 1% de mujeres menores de 40 años y 1/250 mujeres menores de 35 años. Esto conlleva disfunción ovárica y serias dificultades para conseguir un RNV. Se caracteriza por ser un hipogonadismo hipergonadotrópico en el que los niveles de estrógenos están disminuidos y las gonadotropinas aumentadas. POI se diagnostica cuando la FSH (hormona foliculoestimulante) es superior a 40 UI/L en dos muestras diferentes separadas por el tiempo; hay una baja concentración de estradiol (< 50 pg/mL) y de hormona antimulleriana (AMH $< 0,9$ ng/mL), así como un bajo recuento de folículos antrales. Además, las mujeres presentan oligomenorrea mínimo de 4 meses [7]. Esta afectación puede surgir por causas genéticas (síndrome X frágil, entre otros) en el que los niveles hormonales suelen ser normales. Otras de las causas pueden ser inmunológicas y médicas, aunque la mayoría son causas idiopáticas. Cuando hablamos de una causa médica se refiere a que actualmente la tasa de supervivencia de cáncer es de aproximadamente un 80%. La mayoría de ellas son pacientes que han realizado tratamientos quimio/radioterapéuticos, los cuales son gonadotóxicos y alteran la función ovárica, dificultando un embarazo espontáneo y RNV.

Distinguiremos entre las diferentes estrategias según el tipo de célula madre utilizada hasta el momento. En los estudios clínicos participan pacientes femeninas que presentan reserva ovárica disminuida, POI, mujeres perimenopáusicas, bajo respondedoras (BR) o con disminución de la reserva ovárica en consecuencia a tratamientos gonadotóxicos. Todos los estudios aportan sus análisis estadísticos correspondientes para determinar la significancia de los resultados. Estos se consideran significativo cuando P valor < 0.05 .

3.1.1 Células madre derivada de la médula ósea

Herraiz S. y su equipo de investigación, en 2018, publicaron un diseño experimental en modelo animal para evaluar la eficacia regenerativa de las células madre sobre el deterioro ovárico [8]. Los investigadores utilizaron células madre de la médula ósea para restaurar la función ovárica y por consecuencia, la fertilidad. Las células madres de la médula ósea (BMDSCs, *del inglés bone marrow derivated stem cells*) de pacientes BR se movilizaron a la circulación general mediante inyecciones, durante 5 días, de G-CSF (*del inglés, granulocyte*

colony stimulating factor) que es un factor estimulante de colonias de granulocitos. Luego se recuperaron por aféresis siguiendo los protocolos estándar. Hicieron dos grupos experimentales. Todos los grupos contenían ratones hembras inmunodeficientes con daño ovárico inducido mediante la administración de fármaco quimioterapéutico (FQ) en dosis baja(0.1FQ) y dosis estándar (1FQ). En un grupo, los ratones fueron inyectados por vía intravenosa a través de la cola con BMDSCs. El otro grupo fue inyectado con células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs, *del inglés peripheral blood mononuclear cell*) pero sin movilización de las BMDSCs para comprobar que las propiedades regenerativas se producen por las células madre y no por ningún componente presente en la sangre. Igualmente, había un grupo control al que se le administró solución salina.

Además, en el mismo diseño experimental realizaron xenotransplantes a ratones de tejido ovárico de mujeres BR. De esta forma se puede observar el efecto directo que tiene estas células madres en el tejido ovárico humano. En este grupo experimental se realizó el mismo procedimiento que el anterior, con la única diferencia que no indujeron el daño ovárico con quimioterapéuticos. Además, de la inyección de BMDSCs, también se aislaron una subpoblación celular de éstas denominada CD133+, que han demostrado aumentar la proliferación celular y la neoangiogénesis en la literatura científica.

Para evaluar el resultado del experimento, monitorearon el ciclo estral de los ratones, el cual estaba alterado previamente a la inyección de BMDSCs debido al efecto tóxico del FQ. Los resultados obtenidos se centraban en la morfología, recuento de folículos ováricos y el peso de los ovarios. Posteriormente, se tuvo en cuenta el número de oocitos MII y embriones obtenidos tras una estimulación ovárica controlada y apareamiento con machos fértiles. Además de la densidad microvascular de los ovarios, así como la concentración de células proliferativas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1. Estos evidencian que las BMDSCs son capaces de regular el ciclo de los ratones hembras, en su mayoría. También aumentó significativamente el peso ovárico y el n° de folículos preovulatorios. El recuento de folículos antrales fue superior en dicho grupo, aunque solo fue estadísticamente significativo en ratones administrado con dosis alta de quimioterapia ($P = 0.01$). La morfología ovárica era normal, mientras que, en los otros grupos experimentales, tanto el de control como los tratados con PBMNCs contenían un porcentaje mayor de células apoptóticas, causada por la administración de FQ. Y no solo eso, además de presentar un descenso significativo en dichas células, los tratados con BMDSCs, presentaban un incremento en células proliferativas.

	Grupo control	Grupo PBMNC	Grupo BMDSC
Morfología	Célula granulosa apoptóticas <i>P = 0.03</i>	Célula granulosa apoptóticas <i>P = 0.03</i>	Normal (Reducción de 10 veces células apoptóticas con respecto control y PBMNC)
Folículos antrales	(0.1FQ) 5.3±2.2	5.1±0.9	8.9±5.8
%	(1FQ) 5.9±2.9	4±2.1	10.6±2
Ciclo	Fase metaestro y fase diestro	Fase metaestro y fase diestro	Fase estro (regulación ciclo del 75%)
Peso ovárico			Aumento significativo
DMV	- <i>P = 0.012</i>	- <i>P = 0.049</i>	Aumento de 2.8 veces con respecto a control y PBMNC
Proliferación celular	- <i>P = 0.045</i>	-	Aumento de 2 veces con respecto control
Oocitos MII	- <i>P = 0.04</i>	-	Aumento de 4 veces con respecto control
Embriones (2 células)	-	-	Obtención de 3,5 veces más (1FQ)
Embarazos espontáneos	(1FQ) 0 (0.1FQ) 1	0 1	3 consecutivos
Crías vivas totales	(1FQ) 0 (0.1FQ) 19	0 5	24 31
Crías/camada	6.3±0.9	5±0.0	8±0.8

Tabla 1. Resultados obtenidos de la aplicación de BMDSC en ratones hembras con daño ovárico inducido (8). Nota: FQ = Fármaco quimioterapéutico; DMV = Densidad microvascular

La densidad microvascular también se potenció, aunque solo fue significativo en los ratones administrados con las dosis altas de quimioterapia en comparación con el grupo control y PBMNCs (Figura 1).

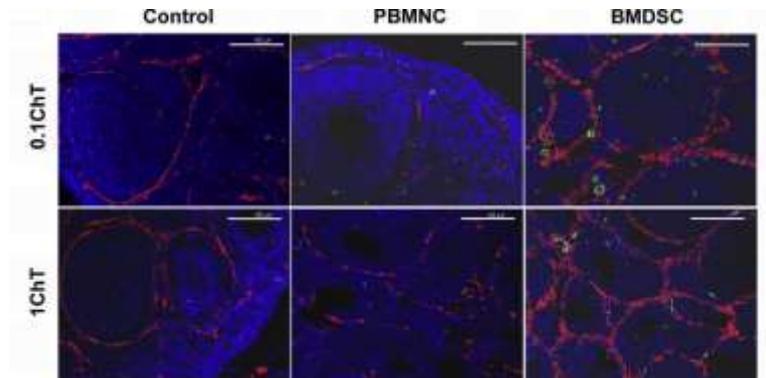


Figura 1. Resultados de la densidad microvascular en los 2 grupos experimentales y control (8).

El número de ovocitos recuperados en metafase II tras la estimulación ovárica fue 3 veces superior en BMDSCs con respecto al grupo control, aunque solo resultó significativo en el grupo administrado con bajas dosis de quimioterapia.

Tras 12 semanas de la infusión celular, permitieron el apareamiento de las hembras con machos fértiles. Esto dio lugar a 3 embarazos espontáneos consecutivos con aproximadamente 8 crías vivas y sanas por camada en el grupo tratado con BMDSCs. En cambio, en el grupo tratado con PBMNCs y control, solo consiguieron 1 embarazo espontáneo, en aquellas hembras administradas con dosis baja de quimioterapia y además el número de cría por camada fue inferior.

En el grupo experimental con xenotransplante los parámetros a analizar resultaron mejores tanto en el grupo tratado con BMDSCs como con CD133+, con respecto al grupo control. Se analizaron la presencia de células proliferativas en el ovario, el crecimiento folicular, folículos secundarios y la densidad microvascular. El crecimiento folicular fue detectado tras 14 días de la inyección en el grupo BMDSC ($43.9 \pm 0.7\%$) y CD133+ ($43.7 \pm 6.2\%$). En el grupo control se detectó $11.7 \pm 10.3\%$ pero solo fue significativo en el grupo tratado con BMDSC ($P = 0.04$). Los folículos secundarios fueron observados a partir del día 14 de la inyección en el grupo CD133+, aunque en el grupo BMDSC se detectaron a partir del día 7 en el xenotransplante, siendo significativamente estadístico en este grupo. La DMV aumentó a partir del día 7 en ambos grupos y se mantuvo hasta el día 14 de la inyección (Figura 2).

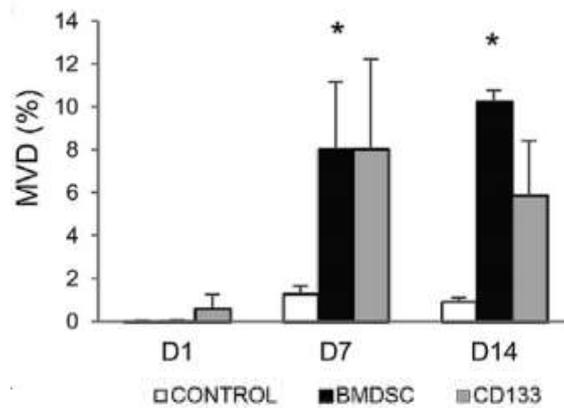


Figura 2. Resultados de la densidad microvascular en el grupo experimental de xenotransplante de tejido ovárico de mujeres BR en ratones hembra (8).

Nota: * = Estadísticamente significativo el grupo BMDSC; MVD = Densidad microvascular

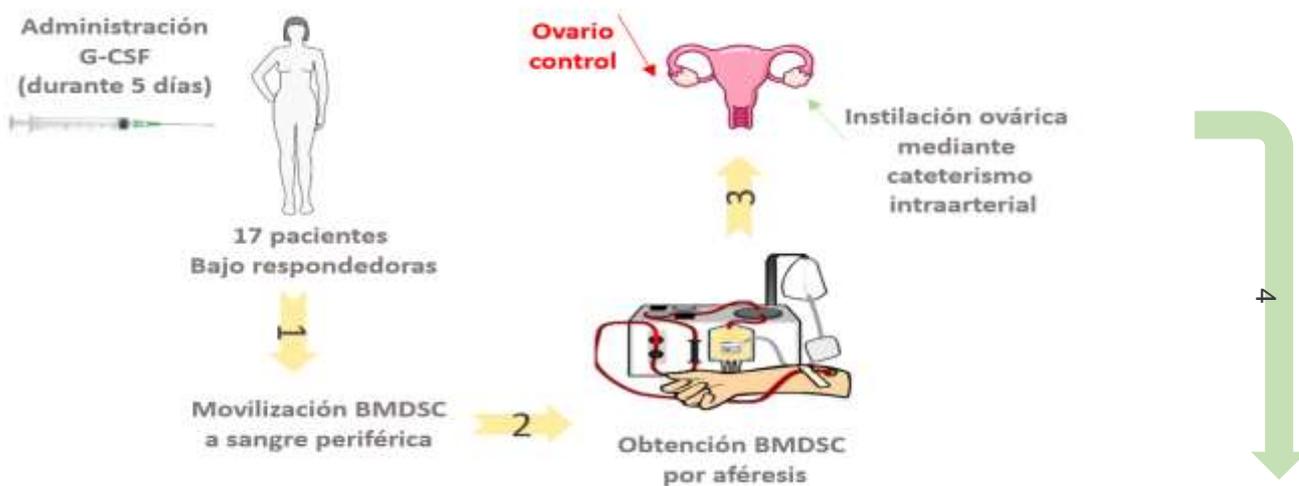
La proliferación celular se evaluó mediante la presencia de células positivas para Ki-67 (biomarcador de células proliferativas), siendo superior y significativamente estadístico en el grupo BMDSC con respecto al grupo control, tras 14 días del tratamiento. Además, se evaluó la concentración de estradiol observándose un incremento significativo en plasma sanguíneo de los ratones con respecto al grupo CD133+ y control (control: 1.1 ± 2.1 pg/mL; BMDSC: 11.8 ± 5.6 pg/mL; CD133+: 3.1 ± 2.9 pg/mL).

En base a este experimento Herraiz S. y colaboradores en 2018 realizó un estudio prospectivo observacional, en el que participaron 17 pacientes BR, para aportar más evidencia y significancia a los resultados obtenidos en el estudio anterior. En este se realizó trasplante autólogo de células madre en el ovario (*ASCOT, del inglés autologous stem cell ovarian transplantation*). La movilización de las BMDSCs a la sangre periférica fue idéntica al diseño anterior, con la administración de G-CSF y la obtención por aféresis, pero en este caso fueron instiladas mediante un cateterismo intraarterial a la arteria ovárica en un solo ovario. El otro ovario se utilizó como control [9]. Los resultados se midieron en 3 grupos: análisis de la reserva ovárica mediante RFA (recuento de folículos antrales) y concentración de AMH (*del inglés, antimullerian hormone*) en el suero, composición celular y factores de crecimientos solubles tras el tratamiento y, por último, los TRA y los resultados reproductivos que se corresponde con el número ovocitos MII recuperados tras estimulación ovárica, embriones obtenidos y embarazos espontáneos. Con respecto a la reserva ovárica se vio una diferencia significativa en el RFA el día 15 después de ASCOT con respecto a antes de la terapia, con un

incremento de 3 o más folículos. Este aumento sucedió desde el día 2 hasta 43 días post instilación de BMDSC.

El RFA fueron similares en ambos ovarios, sin diferencia significativa entre el ovario infundido y el ovario control. La concentración de AMH se incrementó en la mayoría de las pacientes (11-16 pacientes) aunque no resultó estadísticamente significativo cuando se analizó en conjunto. Se determinó que la reserva ovárica mejoró un 81.3% (13 de 16 pacientes), del cual 37.5% mejoró en ambos criterios (6 pacientes), 12.5% incrementó solo en RFA (2 pacientes) y 31.5% mejoró solo en AMH (5 pacientes).

Las mujeres que tuvieron respuesta positiva después del tratamiento con ASCOT tanto en el RFA como en AMH presentaban una concentración mayor significativa de FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos-2) y THSP-1 (trombospondina-1). En cambio, para los factores de crecimiento IGF-1 (factor de crecimiento insulínico-1) y PDGF-BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB) no se detectó una correlación significativa con los resultados. Las pacientes fueron sometidas a ciclos de estimulación ovárica controlada para la recuperación de ovocitos pre y post tratamiento. Se determinó diferencia significativa entre ambas siendo superior después de ASCOT (70.8% ovocitos totales a 82.1%). Los resultados y el proceso del tratamiento se resumen en la figura 3.



RESULTADOS RO	PREVIO A ASCOT	TRAS ASCOT (día 15)
AMH (pM)	1.9±0.6 (2)	2.1±2.1 (1.7)
RFA	4±1.3 (Total) 1.9±0.8 (Ovario control) 2.2±1 (Ovario infundido)	4.9±2.2 (Total) 2.1±1.7 (Ovario control) 2.7±1.5 (Ovario infundido)

RESULTADOS REPRODUCTIVOS	Estimulación ovárica controlada	
	24 ciclos en total (15 pacientes)	28 ciclos en total
	PREVIO A ASCOT	DESPUÉS DE ASCOT
OVOCITOS RECUPERADOS	70.8% Total 54.2% = 35 (ovocitos MII)	85.7% total 82.1% = 51 (ovocitos MII)
TASA DE CANCELACIÓN	29.2%	14,2%
EMBRIONES Obtenidos tras ICSI	50% = 24 Total (13 de buena calidad por criterio morfológico)	67.8% = 36 Total (60% calidad A y B basado en criterio morfológico)
EMBARAZOS	0	5 total (3 embarazos espontáneos)
RNV	0	3

Figura 3. Procedimiento de ASCOT y resultados del estudio (9).

Tras la obtención de los ovocitos se realizó ICSI con espermatozoides en fresco. Finalmente se lograron 5 embarazos de 16 pacientes, de los cuales 3 fueron espontáneos y tuvieron recién nacidos sanos. La tasa de cancelación disminuyó a 14.2% de 29.2%. Cabe destacar que las cantidades de gonadotropinas utilizadas durante la estimulación ovárica para la obtención de los ovocitos fueron similares previo y posterior al tratamiento. El tratamiento con ASCOT mejoró la fertilidad de un 68.6% a 74.5%.

Tandulwadkar S. et al, en 2020 publicaron un estudio piloto de intervención donde querían estudiar el efecto sinérgico de las células madre autólogas derivadas de la médula ósea (ABMDSC, del inglés autologous bone marrow derived stem cells) y el PRP. Participaron 20 mujeres que presentaban baja respuesta ovárica según los criterios de POSEIDON (del inglés, Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number). Presentan unas características determinadas, entre las que se encuentra un RFA < 5, AMH < 1.2 ng/mL y mujeres < 35 años y mayores \geq 35 años [10].

En este caso obtuvieron BMDSCs mediante aspiración de la espina iliaca posterior de la médula ósea bajo anestesia general. Aspiraron aproximadamente 150 mL y se utilizó un separador de células totalmente automatizado para obtener 16 mL de BMDSCs. Se realizó un recuento de células madre mediante el citómetro de flujo y se detectó 5-13 millones células/mL, aunque este factor dependía de cada paciente.

Para la obtención de PRP se realizó una extracción de 20 mL de sangre periférica en tubos con heparina. Tras una doble centrifugación se utilizó 2 mL de la columna de plasma de color amarillo donde se concentra la mayor parte de las plaquetas y factores de crecimiento, evitando coger la columna de eritrocitos y la capa fina blanquecina leucocitaria. Esto se

mezcló con los 16 mL de ABMDSC y se procedió a una instilación ovárica por vía transvaginal guiada por ultrasonido bajo anestesia general o por vía laparoscópica cuando por la anterior no se podía acceder al ovario.

Se observó semanalmente el RFA y AMH. En la 6^o semana se realizó estimulación ovárica controlada y se realizó punción a las 35 horas posteriores de la inducción con hCG para evaluar la obtención del número de ovocitos MII y la cantidad/calidad de los embriones post ICSI. Los resultados fueron comparados con los datos obtenidos antes de la terapia. Se manifestó un aumento significativo de RFA (3.35 ± 0.98 a 5.7 ± 1.75). Se detectó un incremento de la concentración de AMH después de la instilación, pero no fue significativo. Seguidamente de la estimulación ovárica controlada a las pacientes, se determinó el número de ovocitos MII que se había reclutado y se correlacionó con el RFA. Esto resultó en una correlación positiva entre ambas, obteniendo un mayor número de ovocito MII cuando el RFA también lo es. Igualmente se obtiene una correlación negativa entre el número de oocitos MII y la edad avanzada de las mismas.

Gupta S y su equipo de investigación, publicaron en 2020 un informe de casos de un RNV sano de una mujer perimenopáusica de 45 años después de ASCOT [11]. La paciente llevaba 3 años con ciclos irregulares y presentaba una concentración de AMH de 0,4 ng/mL y un RFA de 1. El método de extracción de las células madre de la médula ósea fue similar al artículo anterior variando en las concentraciones y se realizó mediante instilación laparoscópica en el ovario de 1-2 mL de ABMDSCs a través de 5 punciones en sitios diferentes en el ovario. Tras 8 semana del tratamiento se realizó un RFA mediante ecografía y reveló un total de 2 folículos, así como un aumento de la AMH a 0.9 ng/mL. Se le realizó una estimulación ovárica y se obtuvieron 3 ovocitos. Después de FIV se consiguió un embrión de calidad A. Se hizo una transferencia embrionaria única (SET) y a la sexta semana se demostró una gestación viable intrauterina por vía ecográfica. Fue necesario realizar una prueba prenatal no invasiva, ya que el embarazo en mujeres con edad avanzada implica una mayor probabilidad de embriones genéticamente anormales, pero en este caso mostró un cariotipo normal. Es el primer caso reportado de una mujer con 45 años, ya que casi todos los estudios se centran en mujeres menores de 40 años con POI.

3.1.2 Plasma rico en plaquetas (PRP)

El tratamiento con plasma rico en plaquetas, ya es una práctica clínica que se realiza en

diferentes ámbitos de la medicina regenerativa, pero que prácticamente se está empezando a usar ahora en el campo de la RA para el rejuvenecimiento ovárico y de endometrio. La infusión en el ovario de PRP se basa en la estrategia donde las plaquetas, que intervienen en el proceso de hemostasia, secretan una serie de componentes, como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, tales como PDGF (*del inglés, platelet derived growth factor*), VEGF (*del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor*) y TGF- β (*del inglés, transforming growth factor β*) que ejercen un efecto quimioatrayente sobre células madre mesenquimales de distintos orígenes como miocitos, osteoblastos, fibroblastos y células endoteliales [4]. Esto sucede tras la activación plaquetaria promoviéndose la migración y proliferación celular, induciendo la angiogénesis y regeneración tisular [13]. La activación plaquetaria *in vitro* se realiza con gluconato cálcico o cloruro de calcio, principalmente. Este proceso se realiza después de la extracción de la sangre periférica, centrifugación y obtención del sobrenadante de color amarillo que se correspondería con el plasma sanguíneo dejando en el inferior una columna de eritrocitos en rojo y una capa fina blanquecina leucocitaria. El plasma restante tiene concentraciones de factores de crecimiento de 5 a 10 veces más altas que la sangre total, de ahí su interés clínico. Hay numerosos estudios tanto en modelo animal como en estudios clínicos, que si demuestran una mejora de la fertilidad de ratones hembras con daño ovárico inducido y de mujeres BR o con POI.

Petrik N. y su equipo de investigación en 2020, realizaron un estudio en el que participaron 38 mujeres BR durante 5 años y dos intentos fallidos con FIV. Para la obtención de PRP primero realizaron una extracción de sangre en 2 tubos de coagulación de 8,5 mL con citrato sódico. Una vez obtenido se centrifugó durante 3 minutos a 800 rpm. Finalmente se obtuvo 2 mL de PRP con una concentración de 1×10^6 millones/mL de plaquetas y se inyectó 0,7 mL en cada ovario a través de una aguja guiada por ecografía. Cuando fue imposible llegar a los ovarios por vía vaginal se hizo laparoscopia. El seguimiento de las pacientes fue hasta 12 meses después del tratamiento y se tuvieron en cuenta diferentes criterios: Los niveles de LH (hormona luteinizante), FSH, AMH y E2. Además de las tasas de embarazo y el % de ovocitos recuperados. La LH y FSH tuvieron un descenso significativo con respecto antes del tratamiento, así como un aumento significativo del E2. Esto indica la reversión de los parámetros característicos de mujeres bajas respondedoras a concentraciones normales [12]. El incremento de la AMH fue acusado tras 12 meses del tratamiento con PRP, llegando a obtener unos valores de casi 1.2 ng/mL en determinadas pacientes. Antes del tratamiento había pacientes con 0.08 ng/mL, por lo que PRP si consiguió una mejora en la concentración de AMH, aunque no se pudo obtener resultados concluyentes al respecto porque había

variación entre pacientes. Se consiguieron 4 embarazos y RNV concebidos de forma natural. En la literatura también se ha demostrado una regulación del ciclo menstrual tras 48 o 72 días después de la inyección de PRP [13].

3.1.3 Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales, mencionadas anteriormente, se han investigado en estudios clínicos y preclínicos sobre su acción en la restauración de la función ovárica y endometrio. Estas células proceden de tejidos heterogéneos, tienen la capacidad de migrar al tejido ovárico dañado y mediante acciones paracrinas, potenciar la función ovárica [13]. Las células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical han sido utilizadas en diversos estudios para estudiar su implicación terapéutica en el rejuvenecimiento ovárico en pacientes con POI. Ding L y cols, publicaron en 2018 un estudio basado en el cocultivo de **células madre mesenquimales del cordón umbilical** (*UCMSCs*, del inglés *umbilical cord stem cells*) en un andamio de colágeno para evaluar el efecto sobre la activación de los folículos primordiales en ovarios. Las UCMSC mostraron tener un efecto positivo en los folículos a través de la fosforilación de los factores de transcripción FOXO3 y FOXO1, 6 horas después de haber iniciado el tratamiento en ratones hembra [14]. FOXO3 es el supresor principal de la activación del crecimiento de los folículos primordiales, manteniendo estos en un estado latente en ratones. Estos factores están regulados a través de la vía de señalización PI3K (fosfoinositol-3-quinasa) AKT. La inhibición de AKT mediante su fosforilación implica la retención de FOXO3 en el núcleo permitiendo la síntesis de genes implicados en la apoptosis, estableciéndose así una regulación negativa del crecimiento celular. Cuando existe una activación de AKT, quedando ésta sin fosforilar, da como resultado la exportación nuclear de FOXO3 al citoplasma, bloqueando la síntesis de los genes apoptóticos y permitiendo el crecimiento celular al impulsar la síntesis proteica. Finalmente, este conjunto de procesos da lugar a una activación folicular [4].

En base a esto, realizaron un experimento en el que participaron 14 pacientes entre 18 y 39 años con POI a las que mediante inyección intraovárica se le administró UCMSCs a 6 pacientes y Colágeno/UCMSCs a las 8 pacientes restantes. Se le realizó un seguimiento hasta los 3 meses después del tratamiento analizando FSH, E2 y volumen ovárico. Se observó una disminución de FSH en ambos grupos, siendo significativamente estadístico en el grupo Colágeno/UCMSCs que paso de tener, control: 54.18 ± 9.98 a 24.29 ± 5.11 mUI/mL. El E2 por su parte, aumentó después del tratamiento siendo significativo también en este grupo (Control: 116 ± 24.93 a 166.31 ± 34.29 pg/mL). Por otra parte, el volumen ovárico mostró ser

mucho mayor tras el tratamiento en el grupo tratado con UCMSC (Control: 788.29 ± 230.289 a 3405 ± 1875 mm³) y en cambio en el otro grupo experimental no se detectó mejoría significativa. La actividad folicular solo se mostró en una paciente del grupo UCMSC y en 5 pacientes del grupo Colágeno/UCMSC. Se observaron folículos > 12mm en varias pacientes de ambos grupos e incluso se encontraron ovocitos maduros en una de las pacientes. Se consiguió 2 embarazos naturales después de un año del tratamiento. A uno de ellos se indujo el aborto por trisomía y el otro siguió su curso. Las UCMSCs secretan factores de crecimiento como IGF, FGF β , VEGF y BDNF (*del inglés, brain derived neurotrophic factor*) y citoquinas que parecen ser secretadas en mayor proporción cuando éstas se cocultivan con colágeno. Este aumento favorece a la activación directa de la vía PI3K-AKT que manda diferentes señales a los ovocitos y células de la granulosa. De esta manera promueve la activación y crecimiento de los folículos primordiales, así como la proliferación y disminución de apoptosis en células de la granulosa. Según estos estudios, la fertilidad se restaura parcialmente tanto en ratones con daño ovárico inducido como en mujeres con POI después del tratamiento con las UCMSCs.

Otro tipo de célula utilizada son las **células madre mesenquimales adiposas** (*ADMSCs, del inglés adipose tissue derived stem cells*). Son fáciles de obtener mediante el tejido adiposo del brazo, muslo o abdomen donde hay una mayor concentración de este tipo de células y de cultivar *in vitro*. La mayoría de los ensayos realizados han demostrado ser favorecedores para la mejora de la función ovárica. Inducen la angiogénesis a través de factores de crecimiento secretados como VEGF y SDF 1, la proliferación folicular ovárica e inhiben la apoptosis de células de la granulosa mediante la secreción de FGF y TGF β [15]. Al igual que con las UCMSCs se estudió el cocultivo con andamio de calcio y pareció mejorar los resultados con un mayor retenimiento de las ADMSCs en el sitio de la inyección, aumentando el tiempo de prolongación de los resultados. Se restableció la función ovárica y mejoró la tasa de embarazo en comparación con la inyección de ADMSC aislada.

3.2 Estrategias para infertilidad masculina

3.2.1 Células madre espermatogoniales (SSCs)

Diferentes artículos se centran en una estrategia basada en células madres espermatogoniales para preservar la fertilidad masculina (*SSCs, del inglés spermatogonial stem cells*) de pacientes prepúberes con cáncer o de adultos con infertilidad severa como la azoospermia. El

objetivo de este tipo de terapias es la inducción de la espermatogénesis en varones. Las SSCs son células espermatogénicas diploides indiferenciadas presentes en la membrana basal del tubo seminífero que presentan capacidad pluripotente. Éstas intervienen en el proceso de espermatogénesis teniendo un papel fundamental en la autorrenovación de las mismas, para mantener los niveles basales y en la diferenciación celular a otros tipos de células espermatogénicas hasta formar los espermatozoides maduros, que se encontraran en la luz del tubo seminífero.

Este proceso es imprescindible para la fertilización masculina, ya que si no se producen espermatozoides no hay fertilidad. Las SSCs comienzan a dividirse mitóticamente para dar lugar a espermatogonias tipo A y tipo B, involucrándose en un proceso de diferenciación que dará lugar a los espermatoцитos primarios a través de divisiones meióticas hasta la formación de los espermatozoides. Este proceso está regulado por factores extrínsecos e intrínsecos. Entre ellos se encuentran el factor neutrófico derivada de células de la glía (GDNF), que es secretado por células de sertoli y que cuya expresión va disminuyendo a medida que aumenta la edad, en ratones. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2; FGF-5), también es necesario para el cultivo y para la diferenciación celular. Las proteínas morfogénicas óseas 4 y 6 (BMP4, BMP6), así como el factor derivado de células estromales (SDF1 / CXCL12) y el factor estimulante de colonias 1 (CSF 1) son algunos de los factores que están implicados en la regulación del mantenimiento y la diferenciación de las SSCs [5,16]. Además, las células presentes en los testículos como las células de sertoli y células de Leydig presentan receptores de hormonas, en el que entra el juego el eje hipotálamo – hipófisis – testicular.

En diferentes estudios han conseguido la expansión y diferenciación *in vitro* de SSCs de ratones, primates y humanos [5, 16].

Para el crecimiento *in vitro* de SSCs es necesario un microambiente similar a donde se encuentran en el nicho testicular para inducir la renovación de las células madre y la diferenciación de dichas células para la producción de espermatozoides.

En ratones han logrado la expansión y diferenciación de las mismas en cultivos con andamios de nanofibras y un microambiente determinado. Las células testiculares se cultivaron todas juntas sin aislar las SSCs en medio de cultivo basal (Eagle), ampliamente utilizado que permite el cultivo de células de mamífero con una suplementación reducida de suero fetal bovino, penicilina y estreptomicina. Se suplementó el medio con GDNF, FGF2, mezclas de

lípidos y cocultivo con células del estroma testicular, que han demostrado ser imprescindible para su diferenciación [16].

El aislamiento de las SSCs es difícil, ya que no hay un único marcador de expresión específico para su identificación, por lo que se deben de identificar mediante la presencia de varios marcadores de superficies entre los que están las integrinas A6 y B1, cadherina 1 (CDH1), GFR α 1, ID4, ZBTB16 o PLZF, protooncogén ret (RET), antígeno de células del timo 1 (Thy-1) y grupo de diferenciación 24 (CD24). Estos marcadores son los utilizados para aislar las SSCs procedentes de ratones. Cuando procede de humanos, además de estos marcadores de superficie también se evalúa SSE4 (antígeno embrionario específico 4) y receptor acoplado a proteína G 125 (GPR 125). Igualmente, también se puede detectar marcadores intracelulares.

En otros grupos de investigación han cultivado SSCs junto a células de sertoli con administración secuencial al medio de ácido retinoico (AR) produciendo el inicio de la meiosis y por consiguiente células haploides. Estas se trasplantaron en los túbulos seminíferos de los ratones donde finalmente se diferenciaron en espermatozoides. Dichos espermatozoides fueron sometidos a un proceso de ICSI obteniendo crías vivas y fértiles. La limitación de este estudio fue que el ADN de las células haploides generadas presentaba metilaciones aberrantes en elementos regulables vulnerables.

3.2.2 Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)

Las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier célula de los 3 linajes embrionarios. A partir de éstas se puede inducir la diferenciación a cualquier tipo celular mediante reprogramación genética *in vitro*.

Para tratar el hipogonadismo masculino, recientemente Chen X y su equipo de investigación en 2019, publicaron un estudio basado en la producción de células similares a las de Leydig a partir de hiPSCs, mediante la expresión de compuestos moleculares previamente definidos (iPSC-LC) [17]. El hipogonadismo es una enfermedad que se caracteriza por deficiencia o disminución de testosterona. Esta hormona es secretada por las células de Leydig habitadas en el intersticio testicular. En el desarrollo de las células de Leydig participan las células de sertoli mediante la secreción de DHH, proteína conocida como el erizo del desierto involucrada en la señalización celular promoviendo la formación de LC. Actualmente, la terapia para tratar este tipo de pacientes es la hormonal, mediante la administración de andrógenos exógeno, pero esto conlleva una serie efectos secundarios como el incremento de

trastornos cardiovasculares y tumorigénesis de próstata, así como alteración del eje hipotalámico-pituitario-testicular.

Mediante un protocolo de diferenciación previamente establecido (figura 4), obtuvieron iPSCs – LC, las cuales fueron identificadas mediante western blot. Se detectó la presencia de biomarcadores de proteínas específicos de las células de Leydig (CYP11A1, HSD3B1 y HSD17B3, entre otros), que son enzimas biosintéticas de andrógenos y permiten la producción de la testosterona. Mediante citometría de flujo se reveló el nivel de expresión de dichos marcadores, los cuales se expresaban en menor porcentaje que en las células de Leydig auténticas. Las células de Leydig presentaban un nivel expresión de 98.53% (CYP11A1), 97.81% (HSD3B1) y 98.70% (HSD17B3). En cambio, iPSCs-LC presentaban 28.42%, 24.42% y 42.18%, respectivamente.

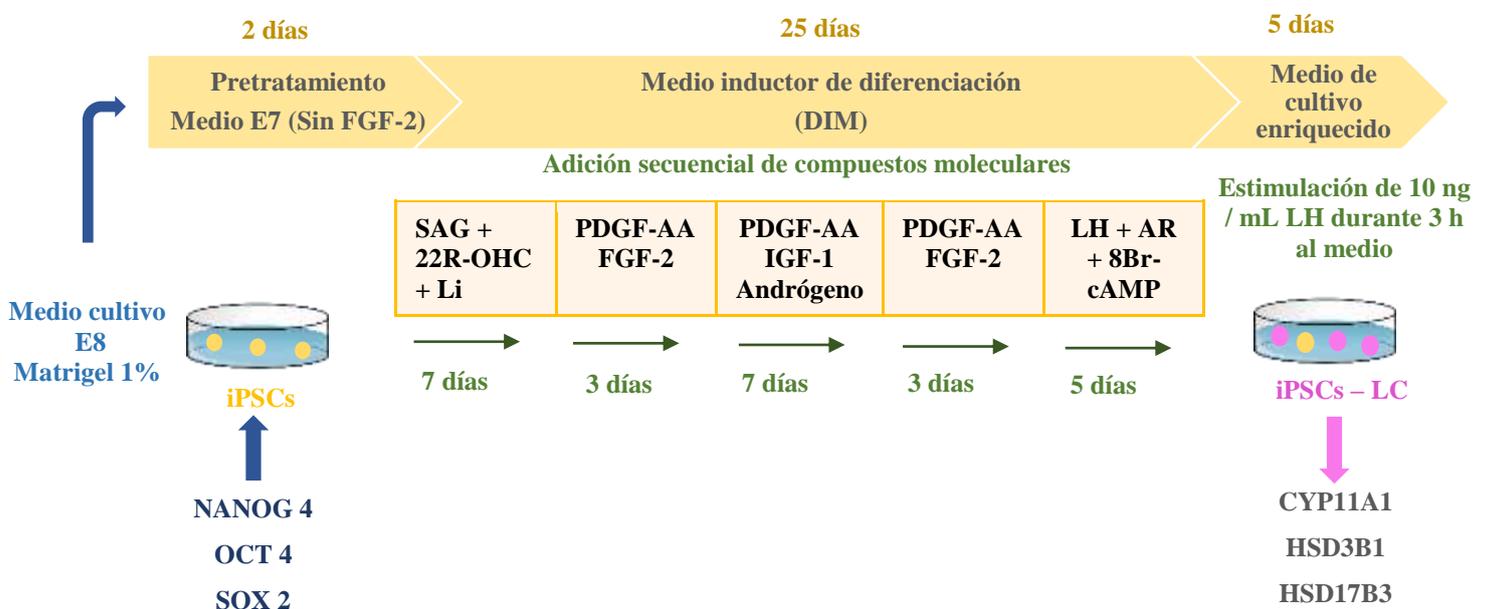


Figura 4. Proceso de diferenciación de las células iPSCs – LC (17).

*Nota: 22R-OHC = 22R-hidroxicolesterol; SAG = Agonista DHH; FGF-2 = factor de crecimiento de fibroblastos 2; IGF-1 = Factor de crecimiento interleucina 1; PDGF-AA = Factor de crecimiento derivados de plaquetas -AA; AR = Ácido retinoico

Una vez identificadas las células (iPSCs – LC) se procedió al trasplante en testículos de ratas machos. Previamente estos se habían tratado con EDS (dimetanosulfonato de etileno), para eliminar las células de Leydig y por consecuencia disminuir drásticamente la concentración de testosterona, pudiendo entonces evaluar el efecto de las células producidas *in vitro*. Tras 14 días de la inyección con iPSCs – LC se detectó un aumento significativo de la testosterona producida por las células con respecto al grupo control que fue tratado con solución salina.

Además, el peso de los testículos también fue recuperado, ya que los niveles bajos de testosterona también interfieren en el peso muscular y testicular.

3.3 Gametogénesis *in vitro*

La generación de gametos *in vitro*, es un enfoque clínico futuro que permitirá descendencia genéticamente propia de aquellos pacientes con gametos no funcionales. Se han realizado múltiples estudios experimentales en modelos animales. Desde que Yamanaka y su grupo descubrieron las células madre pluripotentes inducidas en 2006, se han efectuado múltiples estudios en base a ello, ya que permite obtener gametos a partir de células somáticas reprogramadas. Las hiPSCs están moralmente por encima de hESCs y con ella se disminuye el porcentaje de rechazo inmunológico, ya que se utiliza células del propio paciente a tratar. El objetivo de los estudios es la diferenciación de iPSCs para generar células germinales similares a las primordiales (*PGCs*, del inglés *primordial germ cell*), que son las células progenitoras de los gametos femeninos y masculinos. Las PGCs almacenan y transmiten información genética a través de las generaciones. El entendimiento de los mecanismos de desarrollo de estas células implica una mejor comprensión de la infertilidad. Las restricciones éticas y biológicas hacen difícil acceder a ellas, pero la emergente técnica de las células madre ha proporcionado facilidades para el estudio de los mecanismos moleculares que nos revela en parte la información genética y epigenética, que es indispensable para la comprensión de dichas células. Estos estudios determinan diferencias en el patrón de expresión genética y epigenética entre ratón y humanos que, aunque compartan múltiples de ellos, algunos son específicos de cada especie. En el caso de ratón para la inducción de la diferenciación de células germinales primordiales a partir de mESCs o iPSCs, se ha demostrado que *fragilis* y *stella* son determinante para la diferenciación a PGC. Además, *Prdm1* está altamente expresado debido a su efecto inhibidor y supresor sobre *hoxa1* y *hox1b* y a su efecto inductor de *Prdm14* y *Tfa2c*, que en conjunto mantienen el estado de PGC. Hay que diferenciar entre las PGCs tempranas y las tardías, ya que presentan patrones de expresión genéticos distintos. En este caso *stella* y *Prdm1* constituyen marcadores específicos de PGCs tempranas en ratones [18].

En humanos, el desarrollo de las PGCs comienza aproximadamente en la 4ª semana de desarrollo embrionario. Éstas proceden del ectodermo primitivo y tienen que migrar hasta la cresta genital para comenzar la diferenciación sexual. A partir de la 6ª semana de desarrollo estas sufren una serie de divisiones mitóticas de forma rápida llegando a obtener en la semana

16-20 de desarrollo unos 7 millones de oogonias, en el caso de las mujeres. A partir de este momento el descenso es paulatino e irreversible, aunque la velocidad de descenso varía.

Entre la 6^o y 8^o semana de desarrollo se produce la diferenciación de gónadas, con la consecuente iniciación de la meiosis de las PGCs. Para la formación de las gónadas masculinas es indispensable la expresión de SRY y SOX9, así como la producción de AMH, AR y un patrón de expresión génica esteroidea. Para la formación de los ovarios se ha detectado un conjunto de genes que son expresados en una concentración mayor que en los testículos indicando una correlación positiva. Estos genes son RSPO1, LIN28 y FOXL2, entre muchos otros. En humanos la transición de PGCs tempranas a tardías sucede a partir de la 7^o semana de gestación con el aumento en la expresión de DAZL (*del inglés, Deleted in Azoospermia-Like*) y la disminución de OCT4 y NANOG, que son características de células pluripotentes. Este patrón de regulación es similar en ratones, además DAZL limita la pluripotencia y diferenciación e induce el inicio de la meiosis regulando los pasos de la gametogénesis. Se han utilizado varias estrategias para diferenciar las ESC y iPSC en PGCLCs (*del inglés, primordial germ cells-like cells*). Lo que se ha revelado en los diferentes estudios es que el cocultivo de ESCs o iPSCs con células somáticas gonadales aumenta el rendimiento de la diferenciación de PGCs *in vitro*, aunque no es indispensable.

A partir de estas células madre se pudo aislar PGCs con un nivel de expresión elevado en VASA, marcador específico de PGCs tardías. El cultivo de VASA-GFP y BMP dieron lugar a PGCLC con características epigenéticas similares a las PGCs auténticas.

Los medios de cultivo espontáneos demostraron tener poca eficacia con respecto a la diferenciación, por lo que siguieron experimentando. Descubrieron un medio, denominado actualmente medio 4i que contiene inhibidores químicos y ha mostrado un 43 % de eficiencia en la producción de hPGCLCs siendo suficiente 72 horas de incubación para inducir la diferenciación. Además, añadieron al medio factores de crecimiento como LIF (factor inhibidor de leucemia), FGF β y TGF β [19].

Es necesario el desarrollo de protocolos eficientes para la formación de células germinales primordiales a partir de iPSCs o cualquier tipo de célula madre.

3.3.1 Diferenciación a gametos femeninos

La literatura de la ovogénesis *in vitro* es mucho menor que la producción de gametos masculinos, ya que estos últimos son más accesibles.

En 2018 Yamashiro y colaboradores consiguieron en un estudio experimental células similares a ovogonias humanas. Cultivó hiPSCs con activina 1, que ha demostrado una mejoría en la diferenciación de PGCs y con CHIR 99021 que es un inhibidor selectivo y potente de glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3). Se utiliza para mantener líneas de células madre humanas y de ratón y, en combinación con otros reactivos, también se utiliza para reprogramar químicamente células somáticas en células madre. Al cabo de dos días se obtuvo células incipientes de tipo mesodérmico (*iMeLC*, del inglés *incipient mesoderm-like cells*). Posteriormente, se añadió al medio factores de crecimiento, tales como BMP (proteína morfogenética ósea), SCF (complejo ligasa de las proteínas –F-box), LIF (factor Inhibidor de la Leucemia) y EGF (factor de crecimiento epidérmico), que tienen un efecto positivo sobre las PGCs producidas *in vitro*. Al cabo del sexto día se produjeron agregados de *iMeLC*, a partir del cual mediante FACS (activación de células por fluorescencia) se obtuvieron las células germinales similares a las primordiales que expresaban *Prdm1*-tdTomato, *Tfap2c*-EGFP. Se cultivaron con células somáticas de ovario embrionario de ratón y tras 120 días de cultivo se observó la formación de ovogonias en ovario reconstituido xenogénico [18,19]. Recientemente, en un artículo publicado en julio de 2021 han conseguido la formación de folículos ováricos a partir de mESC. La peculiaridad de este artículo ha sido la diferenciación a dos tipos celulares distintos. Se produjo PGCLC y por otra parte se indujo la formación de células similares a células somáticas de ovario fetal (FOSLC). Una vez obtenidas, ambas se cocultivaron y esto provocó que las PGCLC entraran en meiosis formando los ovocitos y la formación del tejido folicular. Consiguieron fertilizar esos ovocitos y descendencia viva. Estos resultados demuestran la reconstitución de estructuras foliculares funcionales que son totalmente capaces de soportar la producción de ovocitos *in vitro* [20].

3.3.2 Diferenciación a gametos masculinos

Los estudios experimentales realizados sobre espermatogénesis *in vitro* para la consiguiente producción de espermatozoides son más abundante en modelo animal (ratones) que en humanos. En humanos no se ha llegado a producir células similares a los espermatozoides, pero si se han obtenido células haploides como las espermátidas humanas, las cuales poseían marcadores genéticos espermáticos. En este estudio si se descubrió que a partir de hESC y hiPSC tras 14 día de diferenciación es posible obtener entre 1-2% de células haploides. Los marcadores DAZL, DAZ y BOULE regulan el inicio de la meiosis de las PGCLC. Los marcados genéticos presentes en las células haploides obtenidas fueron Acrosina y TEKT1. En este experimento se demostró que el cocultivo con células somáticas gonadales no sería

imprescindible para inducir el inicio de la meiosis, pero quizás si para la finalización de la misma. Estudios realizados en ratones han proporcionado información sobre que a partir de PGCLC se puede inducir la diferenciación a espermatozoides *in vivo*, es decir, la necesidad de trasplantar células haploides espermáticas obtenidas *in vitro* a testículos de ratones. Esto ha dado lugar descendencia mediante ICSI. Pero también se ha producido células haploides espermáticas sin necesidad de trasplante en testículo de ratón. Hay diferentes métodos en la literatura siendo uno de ellos la sobreexpresión de DAZL en mESC, el cual induce la meiosis con la consiguiente formación de células similares morfológicamente a los espermatozoides, células haploides con cola larga y cabeza en un sistema de monocultivo en capas sin cocultivo con células somáticas gonadales [18,19].

4. Discusión de los resultados

4.1 Estrategias para infertilidad femenina

La insuficiencia ovárica prematura provoca una pérdida precoz de la función ovárica antes de los 40 años de edad. Las mujeres con POI pueden presentar síntomas diferentes. La anovulación que puede ser un síntoma común de esta afectación, no tiene por qué expresarse en todas las mujeres que lo sufren. El cese de la función ovárica puede presentarse de manera drástica o como una simple pérdida en la actividad folicular. Por lo que POI tiene diversos grados de expresión sintomatológica. Solo entre el 5-10% puede concebir y dar a luz después de ser diagnosticada de POI y su consecuente tratamiento hormonal. Esto sucede por las fluctuaciones de la función ovárica consiguiendo la ovulación en determinados momentos aumentando la probabilidad de embarazo. El diagnóstico de POI suele ser idiopático y no conocer las causas que generan dicha enfermedad. Algunas pacientes solo presentan una FSH elevada, otras además pueden tener trastornos menstruales como oligomenorrea, y, por último, el diagnóstico más extremo, cuando sufren agotamiento total de los folículos primordiales. Es un estadio irreversible que se presenta como anovulación, amenorrea, infertilidad y gonadotropinas elevadas. Las opciones actuales en TRA son escasas y no tienen resultados prometedores. Entre ellas se encuentra la terapia de reemplazo hormonal pero que solo consigue disminuir las complicaciones del desequilibrio funcional ovárico y la infertilidad [12]. Muchas de ellas sufren POI debido a tratamientos quimioterapéuticos como tratamiento del cáncer. Estos son gonadotóxicos e induce alteración en la función ovárica. Para preservar la fertilidad de estas pacientes, actualmente solo es posible mediante la preservación de la corteza ovárica, así como la criopreservación de ovocitos antes del tratamiento gonadotóxico. Si esto no fuera posible, la mayoría de estas pacientes deben

recurrir a la donación de óvulos. La estrategia actual con la aplicación de células madre permite detener o retrasar los síntomas de la menopausia o POI. El objetivo de estas terapias es la activación de la población folicular que se encuentran en un estado latente, revirtiendo parcialmente el envejecimiento ovárico. La utilización de BMDSCs en diferentes investigaciones han demostrado prometedoras características para la restauración de la fertilidad femenina. Éstas pueden migrar y permanecer en el nicho ovárico para incrementar el crecimiento folicular en etapa preovulatoria, la vascularización ovárica y, además disminuir la apoptosis en células de la granulosa en ratones con daño ovárico inducido. Esto sucede por un proceso activo denominado *homing*. Cuando se realiza la inyección de células madre en un tejido, en este caso en el ovárico, mediante mediadores biológicos como quimiocinas y citocinas las células madre hematopoyéticas a través del endotelio sanguíneo y vascular migran hasta llegar al tejido en cuestión. Ya en su “nicho” las células madre interactúan con otras células y con la matriz extracelular y liberan factores que reducen el daño local y recuperan el funcionamiento normal del tejido.

El experimento realizado por Herraiz S. et al, 2018, en ratones demostró la mejora de la función ovárica mediante la medición de diferentes parámetros. Consiguió recuperar la secreción de estradiol, así como el ciclo de los ratones hembras que presentaban ciclos irregulares debido a la administración de FQ que dañaron la función ovárica. Aumentó los folículos preovulatorios, así como la densidad microvascular y además hubo un incremento en la proliferación y reducción de la apoptosis celular [8].

El incremento en la proliferación folicular y las células estromales ováricas se debe a la secreción de citocinas de las células madre mesenquimales. Esto permite el rescate de ovocitos no dañados a pesar de la situación gonadotóxica de los ratones hembra. Se consiguieron crías sanas, además de un aumento del número de crías por camada con respecto a los grupos que no fueron tratado con BMDSCs. En este estudio se indujo el daño ovárico mediante la administración de dos dosis distintas de quimioterapia. La dosis 1 FQ se corresponde con la dosis más alta que se emplea en los pacientes oncológicos provocando la infertilidad completa. La otra dosis inferior conlleva la interrupción del ciclo y el desarrollo folicular es deficiente [8]. Esto corresponde a pacientes con daño ovárico no severo como puede ser edad avanzada y pacientes BR ante TRA. Significa que los resultados en este estudio son extrapolables a una población reducida de pacientes oncológicos y que presentan POI. La aplicación de xenoinjertos de tejido ovárico humano de mujeres BR en ratones hembras, evitó las posibles desviaciones que surgiera entre ambas especies, ya que el tejido

ovárico es diferente en ambos. Esto demostró el crecimiento de folículos secundarios, así como una mayor vascularización y proliferación, siendo coherente con los resultados del otro experimento. También mejoró la función endocrina con la secreción de estrógenos. En este caso, que se evaluaron la población celular CD133+, aunque las pacientes mostraron mejoría con respecto al grupo control, los resultados fueron peores que en las pacientes tratadas con BMDSC, por lo que determinadas células o componentes presentes contribuyen a un restablecimiento del nicho ovárico mejor que las CD133+. Las BMDSC han resultado ser efectivas tanto en tejido ovárico humano como en ratones con respecto al desarrollo folicular y angiogénesis. En la literatura, se ha demostrado que la presencia de una red de vasos sanguíneos adecuada en el ovario estima un buen funcionamiento del mismo en cuanto proliferación y funciones endocrinas. Las mujeres BR presentan el índice doppler alterado, el cual representa el flujo sanguíneo ovárico, que en comparación con mujeres de edad avanzada o normorespondedoras presentan éste más disminuido. Por lo tanto, enfocar las terapias en mejorar la vascularización ovárica, sobre todo en pacientes BR puede tener efectos muy positivos, ya que se ha determinado en múltiples estudios la eficiencia de ello sobre el crecimiento folicular, la secreción de estradiol y proliferación de células del estroma ovárico. Las células madre hematopoyéticas endoteliales secretan VEGF que permite la vascularización ovárica. ASCOT también resultó ser beneficioso para las pacientes que participaron en este ensayo clínico. Respaldando los resultados del estudio anterior mejoró considerablemente la fertilidad obteniendo 3 RNV. En cada ciclo realizado de RA antes del tratamiento todas las pacientes tenían mal pronóstico y no se obtuvo ningún embarazo. Se pudo comprobar que la aplicación de ASCOT favorece a la obtención de ovocitos tras estimulación ovárica controlada, aumenta el RFA y además disminuye la tasa de cancelación de los ciclos de FIV. Esto se debe a que las mujeres BR presentan dificultad para obtener ovocitos y hay un alto porcentaje de cancelaciones en los ciclos de FIV debido a la nula recuperación de ovocitos durante el TRA. Con esta terapia se supera dicho obstáculo recuperándose 85,7 % de ovocitos en total de los ciclos iniciados en este estudio. Como se ha mencionado anteriormente, las BMDSC presentan factores de crecimiento solubles presente en el plasma que conlleva un efecto paracrino en el tejido en cuestión, induciendo la regeneración de tejido inducida por células madre. Se demostró una correlación positiva de la presencia de FGF-2 con el incremento de la reserva ovárica. Este es clave en la síntesis de estrógenos y el en desarrollo folicular. La sobreexpresión de FGF-2 provoca la neoangiogénesis y mantiene el crecimiento folicular en el nicho ovárico. Además, otro factor a tener en cuenta es el THSP-1 [9]. Es un factor regulador de angiogénesis ovárica y

foliculogénesis. Su sobreexpresión conlleva efectos regenerativos e incrementa el RFA y AMH. Este factor es inducido por las células CD133+. Se obtuvo los resultados más óptimos en el día 14 tras la inyección y tuvo efecto a medio plazo. ASCOT demostró no mejorar la tasa de euploidías de los embriones de mujeres en edad avanzada. De hecho, de 67,8% embriones obtenidos en su totalidad de las pacientes, solo el 16,1% fue euploide [10]. La terapia con ASCOT es semi-invasiva y fácilmente reproducible, por lo que es muy alentador.

La combinación de BMDSC y PRP resultó en una mejora clínica de RO, tanto en ovocitos MII recuperados tras la punción ovárica como en RFA con respecto antes del tratamiento. Las BMDSC secretan unos factores de crecimiento solubles al plasma y el efecto sinérgico junto a PRP parece aumentar la calidad de los ovocitos y potenciar la vascularización. Los resultados óptimos se obtuvieron a las 6 semanas de la inyección. El efecto sinérgico de ambos, tiene efectos beneficiosos, pero hay que determinar si estos resultados presentan una mejoría con respecto a la utilización de cada una de ellas por separado. Sería interesante estudiarlo en una misma población de pacientes amplia y homogénea, y realizar varios grupos experimentales para poder comparar los resultados. La aplicación de PRP mitiga los síntomas de la menopausia precoz o POI, permitiendo estabilización de FSH, LH, E2 y AMH logrando gestación y RNV. En ese estudio se determinó que la inyección de plasma con una concentración de 1×10^6 plaquetas/mL resultara un efecto duradero en el tiempo. Además, con estas terapias se ha conseguido un RNV de una mujer perimenopáusica con 45 años, por lo que da esperanzas de poder superar la barrera del envejecimiento ovárico en edades más avanzadas [10, 11, 12].

La AMH analizada en los estudios anteriores mostró una mejoría y un aumento en determinadas pacientes, pero cuando se analizaban en conjunto, ese incremento no era significativo estadísticamente. Esto significa que el efecto de los tratamientos anteriores sobre la AMH es muy variable y hay que entender que mecanismos están involucrados para tener un resultado uniforme para que se pueda predecir la respuesta de las pacientes antes del tratamiento.

La aplicación de colágeno/UCMSC mostró también aliviar los síntomas de POI y su objetivo es la activación de los folículos primordiales de la etapa preovulatoria a través de la activación de FOXO3 y FOXO1. Han evidenciado que el cocultivo con colágeno potencia la activación folicular. Esto se debe a la inducción de la vía PI3K-AKT, que mediante la transducción de señales externas de las células de granulosa inicia el crecimiento de los folículos primordiales,

a través del ligando Kit de SCF que aumenta FOXO3 citoplasmático y por tanto el crecimiento de los folículos primordiales. Esto nos permite tener información y saber que la regulación de estos dos factores de transcripción posibilita el retorno de la función ovárica y restauración de la fertilidad [14]. Fue el primer estudio en realizar el trasplante de estas células en ovarios de mujeres con POI, por lo que hay que establecer procedimientos quirúrgicos, cantidad de UCMSC requerida para resultados óptimos y unos protocolos definidos de preparación del cocultivo con andamios de colágeno, además de establecer los criterios adecuados para la inclusión de mujeres con POI.

En realidad, las preocupaciones éticas son mínimas en cuanto a la utilización de las células madre mesenquimales, ya que se derivan de recursos fácilmente disponibles. Las MSC además de presentar las características expuestas en el apartado de resultados, tienen propiedades inmunomoduladoras, que incluso logran reducir tasas de aborto en ratones mediante la regulación de la producción local y sistemática de Th1 y Th2. Son dos citocinas que presentan un patrón de secreción distinto (IL-10, TGF- β ; IFN- γ , TNF- α) permitiendo aumentar el embarazo clínico y el parto de crías vivas. Por lo que las células madre mesenquimales poseen características interesantes para su posible aplicación en la práctica diaria en un futuro.

Las limitaciones de estos estudios son las poblaciones a estudiar, deben de ser más amplias y homogéneas para evitar variaciones en las respuestas y determinar qué tipo de pacientes se ven favorecidas con esta terapia. A día de hoy, es imposible predecir la respuesta de las pacientes a dicho tratamiento, por lo que no se sabe si será efectivo o no. En el caso de TRA como FIV o ICSI que se usan en la práctica diaria, tienen establecidos unos porcentajes de éxito de pacientes con unas características determinadas, aunque siempre haya excepciones. Es indispensable seguir estudiando los componentes y células que contribuyen a una mejora en la fertilidad femenina para obtener los resultados más óptimos. También es interesante aplicar protocolos estándar e investigar con qué cantidad de células se obtiene los mejores resultados para que tenga un efecto duradero en el tiempo, y además podamos saber con certeza que tiempo debe transcurrir tras la intervención para obtener los resultados más óptimos con los TRA. Con respecto a la intervención, el objetivo es encontrar un método quirúrgico poco invasivo que no provoque efectos secundarios graves tras la intervención. Se ha visto que la inyección ovárica guiada por ecografía o ultra sonido en su mayoría no presentan problemas postquirúrgicos al igual que con la laparoscopia, por lo que ambos métodos son interesantes.

4.2 Estrategias para infertilidad masculina

Al contrario que con las estrategias para la infertilidad femenina, la aplicación de SSCs, aunque tenga resultados prometedores en un futuro, los datos obtenidos deben ser usados con cautela. Aunque se haya conseguido descendencia fértil en ratones a partir de espermatozoides diferenciados, hay una serie de preocupaciones por los cambios genéticos y epigenéticos que mostraban en dicho experimento [16].

La producción de iPSC-LC implica una novedosa herramienta para los varones con hipogonadismo, que afecta al 30% de los hombres entre 40-79 años. Estas células han demostrado sobrevivir en el intersticio testicular de ratones e incluso recuperar la testosterona en suero y peso testicular [17]. Se examinaron las dosis necesarias de los factores determinantes para realizar un protocolo de diferenciación que pueda replicarse fácilmente en otros laboratorios. Esto demostró que los factores de transcripción SAG, 22R-OCH y Li ayudan al desarrollo de LC, así como la administración de andrógeno al medio. Además, IGF induce la diferenciación de las células a LC mientras que PDGF y FGF promueven la proliferación de células diferenciadas. Este protocolo surgió su efecto, puesto que las células obtenidas presentaban biomarcadores de expresión específicos de las células de Leydig y presentaban una capacidad similar de síntesis de testosterona. Los estudios experimentales sobre este enfoque clínico deben continuar y determinar si hay otros protocolos que produzca unos mejores efectos y evaluar la duración del mismo. Es importante que dicho procedimiento empleado en ratones sea seguro para aplicarlo en humanos, por lo que es necesario más estudios.

4.3 Gametogénesis *in vitro*

A la vista de todo el trabajo y los estudios recientes, parece probable que en el futuro se puedan generar gametos humanos *in vitro*. Sin embargo, será necesario probar su eficacia y seguridad antes de su uso, por lo que se debe seguir estudiando para evitar anomalías genéticas y realizar protocolos de reprogramación y diferenciación fiables y fácilmente reproducibles. El rápido avance en la producción de células PGCLC a partir de células madre para su consiguiente diferenciación en gametos masculinos y femeninos ha permitido un mejor conocimiento y entendimiento en el desarrollo de dichas células. La tecnología más revolucionaria y prometedora, sin duda ha sido la formación de folículos ováricos a través de un proceso totalmente *in vitro* en ratones y produciendo descendencia sana. De esta manera se eludiría los problemas éticos y legales de la obtención de células somáticas gonadales humanas, para el cocultivo con PGCLC. Esto aporta prometedores avances en líneas

humanas. Además, un enfoque muy interesante es que las ESC y iPSC presentan alta actividad telomerasa, la cual se va desgastando con el paso del tiempo y a medida que las PGC se van diferenciando en los gametos. Teniendo en conocimiento, que los telómeros con una longitud mayor brindan unas ventajas funcionales al organismo, aplicando dicha información, sabemos que las células madre embrionarias presentan telómeros largos y que la expansión *in vitro* de estas células para después diferenciarlas en PGCLC, conlleva posiblemente que los ovocitos formados presenten telómeros más largos y por consiguiente una mayor actividad telomerasa y se pueda obtener beneficios, en cuanto al retraso del deterioro ovárico con la aplicación de gametos producidos *in vitro*.

5. Conclusiones

Los problemas reproductivos tratados en este trabajo son algunos de los que presentan una perspectiva más severa, en cuanto a opciones de tratamiento y pronóstico reproductivo. De ahí, que el continuo avance y estudio sobre tratamientos alternativos para estos tipos de pacientes sea necesario. El avance en la investigación en células madre, promete que, en un futuro cercano, se puedan emplear en la práctica clínica. El rejuvenecimiento ovárico está dando resultados bastante beneficiosos en aquellas pacientes que antes no tenían ninguna opción de conseguir una gestación viable con sus propios óvulos. La utilización de PRP, ASCOT, BMDSCs, MSCs, sigue siendo limitada, ya que es conveniente el perfeccionamiento de las técnicas, a partir de las cuales se han conseguido RNV y una mejora significativa de RO en los estudios publicados. En cuanto, a tratamientos para la infertilidad masculina los resultados obtenidos, aunque sean prometedores, no están tan avanzados. Para finalizar, la gametogénesis *in vitro* dará la opción de utilizar gametos artificiales que contengan unas características mejores en pacientes sin gametos funcionales, disponibles para su TRA. La necesidad de poblaciones de estudios más amplias y homogéneas, así como los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes con este tipo de tratamientos son esenciales para obtener resultados concluyentes y seguros para el uso diario.

6. Bibliografía

1. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in pluripotent stem cells: history, mechanisms, technologies, and applications. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2019; 16(1):3-32. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>

2. Fang F, Li Z, Zhao Q, Li H, Xiong C. Human induced pluripotent stem cells and male infertility: an overview of current progress and perspectives. *Human Reproduction*. 2018; 33(2):188-95. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex369>
3. Pourakbari R, Ahmadi H, Yousefi M, Aghebati-Maleki L. Cell therapy in female infertility-related diseases: Emphasis on recurrent miscarriage and repeated implantation failure. *Life Sciences*. 2020; 258:118181. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118181>
4. Acosta-Bueno C, Cejudo-Román A, Salazar-Vera A, Quiroga-Gil R. Estrategias de mejora de la fertilidad: preservación, rejuvenecimiento y células madre. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*. 2020; 7(1):33-49. <https://doi.org/10.1016/j.medre.2020.02.004>
5. Gauthier-Fisher A, Kauffman A, Librach CL. Potential use of stem cells for fertility preservation. *Andrology*. 2019; 8(4):862-78. <https://doi.org/10.1111/andr.12713>
6. Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic A, Jovicic N, Arsenijevic N, Armstrong L, Djonov V, Lako M, Stojkovic M. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International Journal of Medical Sciences*. 2018; 15(1): 36-45. doi: 10.7150/ijms.21666
7. Polonio AM, García-Velasco JA, Herraiz S. Stem cell paracrine signaling for treatment of premature ovarian insufficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 11: 626322. doi:10.3389/fendo.2020.626322
8. Herraiz S, Buigues A, Díaz-García C, Romeu M, Martínez S, Gómez-Seguí I, Simón C, Hsueh AJ, Pellicer A. Fertility rescue and ovarian follicle growth promotion by bone marrow stem cell infusion. *Fertility and Sterility*. 2018; 109(5):908-18. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.004>
9. Herraiz S, Romeu M, Buigues A, Martínez S, Díaz-García C, Gómez-Seguí I, Martínez J, Pellicer N, Pellicer A. Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders. *Fertility and Sterility*. 2018; 110(3):496-505. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.025>
10. Tandulwadkar S, Karthick MS. Combined Use of Autologous Bone Marrow-derived Stem Cells and Platelet-rich Plasma for Ovarian Rejuvenation in Poor Responders. *J Hum Reprod Sci*. 2020; 13(3): 184-190. doi:10.4103/jhrs.JHRS_130_19
11. Gupta S, Lodha P, Karthick MS, Tandulwadkar SR. Role of Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cell Therapy for Follicular Recruitment in Premature Ovarian Insufficiency: Review of Literature and a Case Report of World's First Baby with Ovarian

- Autologous Stem Cell Therapy in a Perimenopausal Woman of Age 45 Year. *J Hum Reprod Sci.* 2018; 11(2): 125-130. doi:10.4103/jhrs.JHRS_57_18
12. Petryk N, Petryk M. Ovarian rejuvenation through platelet-rich autologous plasma (prp) a chance to have a baby without donor eggs, improving the life quality of women suffering from early menopause without synthetic hormonal treatment. *Reproductive Sciences.* 2020; **27**:1975–1982.
 13. Ulin M, Cetin E, Hobeika E, Chugh RM, Park HS, Esfandyari S. Human mesenchymal stem cell therapy and other novel treatment approaches for premature ovarian insufficiency. *Reprod Sci.* 2021; 28(6): 1688-1696. doi:10.1007/s43032-021-00528-z
 14. Ding L, Yan G, Wang B, Xu L, Gu Y, Ru T, Cui X, Lei L, Liu J, Sheng X, Wang B, Zhang C, Yang Y, Jiang R, Zhou J, Kong N, Lu F, Zhou H, Zhao Y, Chen B, Hu Y, Dai J, Sun H. Transplantation of UC-MSCs on collagen scaffold activates follicles in dormant ovaries of POF patients with long history of infertility. *Sci China Life Sci.* 2018 Dec;61(12):1554-1565. doi: 10.1007/s11427-017-9272-2. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29546669.
 15. Saha S, Roy P, Corbitt C, Kakar SS. Application of Stem Cell Therapy for Infertility. *Cells.* 2021; 10(7):1 613. doi:10.3390/cells10071613
 16. Forbes CM, Flannigan R, Schlegel PN. Spermatogonial stem cell transplantation and male infertility: Current status and future directions. *Arab Journal .*2017; 16(1):171-180. doi: 10.1016/j.aju.2017.11.015
 17. Chen X, Li C, Chen Y, et al. Chen X, Li C, Chen Y, Xi H, Zhao S, Ma L, Xu Z, Han Z, Zhao J, Ge R, Guo X. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into Leydig-like cells with molecular compounds. *Cell Death Dis.* 2019; 10(3): 220. doi:10.1038/s41419-019-1461-0
 18. Li L, Yang R, Yin C, Kee K. Studying human reproductive biology through single-cell analysis and in vitro differentiation of stem cells into germ cell-like cells. *Human Reproduction Update.* 2020; 26(5):670-88. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa021>
 19. Makar K, Sasaki K. Roadmap of germline development and in vitro gametogenesis from pluripotent stem cells. *Andrology.* 2019; 8(4):842-51. <https://doi.org/10.1111/andr.12726>
 20. Yoshino T, Suzuki T, Nagamatsu G, Yabukami H, Ikegaya M, Kishima M, Kita H, Imamura T, Nakashima K, Nishinakamura R, Tashibana M, Inoue M, Shima Y, Morohashi K, Hayashi K. Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells. *Science.* 2021; 373:6552. doi: 10.1126/science.abe0237.