

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

Células madre mesenquimales para el tratamiento de la infertilidad. El potencial de las células de cordón umbilical

Jorge Asensio Paniagua

Tutor: Fernando Bronet Campos

VILLAVICIOSA DE ODÓN, CURSO 20/21

Índice

Resumen	1
Palabras clave y abreviaturas	1
Introducción	2
Hipótesis y objetivos	7
Metodología	8
MSC e infertilidad.....	8
- Obtención de las MSC.....	8
- MSC y la infertilidad masculina.....	9
- MSC y la infertilidad femenina.....	10
Eficacia de las MSC derivadas del cordón en la creación de gametos <i>in vitro</i>	12
- Gametos <i>in vitro</i> masculinos	12
- Gametos <i>in vitro</i> femeninos	13
Células madre con potencial para formar gametos <i>in vitro</i>	14
Discusión.....	17
Conclusiones	20
Bibliografía.....	21

Resumen

La infertilidad es una patología reproductiva. Una de las posibles causas de esta patología es la ausencia de células germinales. Las células madre mesenquimales (MSC) están demostrando ser un componente prometedor para el tratamiento de esta patología, especialmente las derivadas del cordón umbilical debido a sus capacidades proliferativas, de diferenciación y a su obtención no invasiva. Diferentes trabajos han demostrado la capacidad de estas MSC para diferenciarse en células germinales. El objetivo de este trabajo es evaluar los resultados de diferentes estudios sobre las MSC derivadas de cordón umbilical como terapia para la preservación de la fertilidad in vivo e in vitro y su eficacia comparadas con otras células madre. Los resultados obtenidos indican que las MSC intervienen en la recuperación tanto de la espermatogénesis como de la foliculogénesis in vivo mejorando las condiciones del nicho celular. Además, las MSC pueden diferenciarse in vitro a células germinales masculinas y femeninas bajo la inducción de determinados factores o mediante el co-cultivo con otras células. En cuanto a la comparativa con otras células madre, las MSC no tienen limitaciones éticas como las células madre embrionarias (ESC) y presentan mejores resultados que las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Otras células madre con gran potencial para el tratamiento de la infertilidad son las células madre espermatozonales y ováricas (SSC y OSC), estas tienen todavía grandes limitaciones pero también mucho potencial si se trasplantan junto con las MSC.

Palabras clave y abreviaturas

ESC, células madre embrionarias; iPSC, células madre pluripotentes inducidas; MSC, células madre mesenquimales; UC, cordón umbilical; UC-MSC, células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical; WJ-MSC, células madre mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton; SSC, células madre espermatozonales; OSC, células madre ováricas; NOA, azoospermia no obstructiva; POF, fallo ovárico precoz.

Introducción

La infertilidad es considerada una enfermedad del sistema reproductivo masculino o femenino. Se define como la imposibilidad de lograr un embarazo después de 1 año o más de relaciones sexuales sin protección (Fazeli et al, 2018). Esta patología es un importante problema médico-social que afecta a una de cada 6 parejas casadas que no logran concebir (Zhankina et al., 2021). En cuanto a la tasa mundial de infertilidad, esta es de aproximadamente el 15% y la mitad de los problemas de infertilidad están relacionados con la falta de células germinales (Zolfaghar et al., 2020).

Las causas de la infertilidad se pueden dividir principalmente en tres categorías para las cuales la prevalencia es variable: causas o factores femeninos (33 a 41% de los casos de infertilidad), causas masculinas (25 a 39%) y causas mixtas (9 a 39%) por ambos factores en la pareja (Zhao et al., 2019).

Las causas de la infertilidad en los órganos reproductores femeninos incluyen la disfunción ovárica, endometriosis, obstrucción de las trompas de Falopio, síndrome de Asherman y otras anomalías menos frecuentes del tracto reproductivo (Zhao et al., 2019), De todas ellas, una de las causas más importantes de la infertilidad femenina es la disfunción ovulatoria. Esta disfunción no solo provoca infertilidad, también puede conducir a la pérdida del embarazo, al aborto espontáneo y afectar a la capacidad de fertilidad a largo plazo. En la mayoría de los casos, la disfunción ovárica se asocia con quimioterapia, enfermedades autoinmunes y a cirugías ováricas, entre otras afecciones (Chang et al., 2021). Entre las enfermedades relacionadas con esta disfunción, una de las más importantes es el fallo ovárico precoz (POF).

Los casos de infertilidad masculinos se ven asociados con la disminución de la cantidad o calidad de la eyaculación, que puede estar asociada a alteraciones de la espermatogénesis, maduración lenta de los espermatozoides en el epidídimo o permeabilidad incompleta de los conductos deferentes. Las principales causas de la infertilidad masculina son los trastornos genéticos, las infecciones urogenitales, el hipogonadismo, la criptorquidia, el varicocele, los trastornos de la eyaculación, las enfermedades generales y sistémicas y los factores inmunológicos (Zhankina et al., 2021). A pesar de su naturaleza multifactorial, la infertilidad masculina no se ha entendido completamente y la mitad de los casos se consideran idiopáticos o inexplicables. No todos los casos se deben solo a estos factores, en el caso de pacientes con cáncer, muchos agentes quimioterapéuticos exacerbaban las lesiones testiculares, incluidas la oligozoospermia, la teratozoospermia y la azoospermia irreversible, y provocan infertilidad además de una calidad de vida inferior (Zhankina et al., 2021).

Por último, estaría la esterilidad de origen desconocido que afecta a parejas en las que no se encuentran indicios de alteraciones seminales ni en la ovulación.

Actualmente, las técnicas de reproducción asistida son la terapia de elección para tratar la infertilidad, combinadas con tratamientos farmacológicos y/o quirúrgicos (Yang et al., 2014). En pacientes azoospermicos se emplean la recuperación de espermatozoides mediante microtise previa a la ICSI (Gauthier-Fisher et al., 2020), aunque este proceso sigue sin ser completamente efectivo. En algunos centros, actualmente se ofrece biopsia de tejido testicular y criopreservación a niños pre-púberes que se someten a oncoterapia y se ha explorado para pacientes jóvenes de Klinefelter que están en riesgo de infertilidad, como parte de enfoques experimentales, con la esperanza de que se puedan desarrollar estrategias para restaurar la fertilidad en el futuro (Gauthier-Fisher et al., 2019). Los tratamientos modernos de la infertilidad causada por trastornos de la ovulación incluyen la inducción de la ovulación, la fecundación *in vitro*, la donación de óvulos y la gestación subrogada (Chang et al., 2021).

Sin embargo, estas técnicas presentan inconvenientes como un coste muy elevado, estrés físico, emocional y hormonal, resultados poco prometedores y un mayor riesgo de cáncer de ovario y de mama. Además, con estas técnicas en varones azoospermicos es casi imposible obtener buenos resultados (Badawi et al., 2020). Debido a las limitaciones de estas técnicas, es importante explorar otras terapias que sean capaces de superar estos inconvenientes y satisfacer las necesidades de los pacientes.

Las células madre se han convertido en el componente central de la medicina regenerativa (Mohamed et al., 2019). En los últimos años, la obtención de células madre para producir células germinales o para terapia celular se han considerado la solución para los problemas de fertilidad (Zolfaghar et al., 2020). Se han diferenciado varios tipos de células madre hasta conseguir células germinales. Estas han sido principalmente, las células madre embrionarias (ESC), las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y las células madre mesenquimales (MSC) (Zolfaghar et al., 2020).

Numerosas investigaciones demuestran que las ESC tienen la capacidad de diferenciarse y expresar marcadores de las células germinales. Sin embargo, el uso de este tipo de células presenta algunos inconvenientes como la tumorigénesis y la necesidad de destruir embriones humanos para su obtención (Fazeli et al., 2018).

En cuanto a las iPSC, la acumulación de mutaciones genéticas y epigenéticas durante su reprogramación y expansión suponen un problema. Debido al potencial que tienen de transmitir estas mutaciones a la línea germinal, no son las células más seguras para diferenciar gametos (Gauthier-Fisher., 2020).

Las MSC son células multipotentes que destacan por su capacidad de diferenciarse a una gran variedad de tipos celulares bajo estimulación y secretar factores de crecimiento que intervienen en la reparación de tejidos debido a sus efectos antiapoptóticos, citoprotectores y a su capacidad angiogénica y proliferativa, además de intervenir en migración, modulación de la respuesta inmune y como antioxidantes (Kadam et al., 2017; Mohamed et al., 2019). La sociedad internacional de terapia celular (ISCT) reserva el término células madre mesenquimales para aquellas subpoblaciones que muestran las dos propiedades principales de las células madre (autorrenovación y la capacidad de diferenciar múltiples linajes). La ISCT propuso tres criterios para definir las MSC. Primero, las MSC deben ser adherentes al plástico en condiciones de cultivo. Segundo, deben expresar CD105, CD73 y CD90 mientras que carecen de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19. Además de carecer de antígeno leucocitario humano de clase II (MHC-II) y tener bajos niveles de expresión de HLA-DR y MHC-I (lo que reduce la posibilidad de provocar reacciones inmunes tras el trasplante debido a su baja inmunogenicidad). Tercero, estas células deben de poder diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos en condiciones estándar de diferenciación *in vitro* (Kadam et al., 2017; Fazeli et al., 2018; Rady et al., 2020).

Las MSC se han convertido en el tipo de células más eficaz en las aplicaciones clínicas de la terapia celular ya que se ha demostrado que múltiples enfermedades degenerativas y enfermedades relacionadas con el sistema inmune responden al trasplante de MSC (Yoon, 2019). Las MSC presentan la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales dando lugar a osteocitos, condrocitos, adipocitos, células cardíacas y neuronas y células germinales (Kadam et al., 2017). Son capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares dentro de un linaje particular y pueden convertirse en cualquier tipo de célula según la ubicación donde se trasplantaron (Chang et al., 2021). Estas células pueden diferenciarse a células germinales masculinas y femeninas empleando diferentes inductores.

Las MSC se obtienen de diferentes tejidos en adultos y niños, como la médula ósea, del tejido adiposo, del pulmón, del hígado, sangre periférica, sangre menstrual, sangre de cordón umbilical, membrana del cordón umbilical, venas del cordón umbilical, gelatina de Wharton, placenta, decidua, *ligamentum flavum*, líquido amniótico, membrana amniótica, pulpa dental, vellosidades coriónicas de la placenta, membranas fetales, leche materna y orina (Fazeli et al., 2018; Yoon, 2019).

La obtención de MSC de tejidos como la médula ósea y tejido adiposo es invasiva, complicada y dolorosa (Zolfaghar et al., 2020). En cambio, la posibilidad de aislar MSC perinatales de placenta, cordón umbilical y sangre de cordón se ha propuesto como una fuente

alternativa y no invasiva de MSC adultas. Son fáciles de obtener, poseen una mayor capacidad proliferativa en comparación con otras MSC de tejidos adultos, tiempos de cultivo elevados, una mayor expansión, menos senescencia y un alto potencial de diferenciación. Además, la placenta y el cordón proveen de una gran número de MSC comparadas con otras fuentes (Rady et al., 2020; Zolfaghar et al., 2020). De estas, las MSC de cordón umbilical se consideran una fuente infinita de células madre. Pueden aislarse en grandes cantidades, expandirse en cultivo, congelarse/descongelarse y manipularse. Además, el cordón umbilical se ha probado con éxito como fuente de MSC para terapia celular (Mohamed et al., 2019).

El cordón umbilical (UC) es un órgano perinatal que conecta la placenta y el feto, para facilitar el intercambio de nutrientes y gases. La sección transversal del cordón umbilical muestra que el UC se compone de varias partes anatómicas: la membrana amniótica, que contiene dos capas: epitelial y mesenquimatososa, la región perivascular que rodea y protege la sangre vasos sanguíneos, y la parte central constituida por la gelatina de Wharton (Semenova et al., 2021). Por tanto, el cordón umbilical es un órgano complejo del que se pueden extraer MSC de distintas regiones.

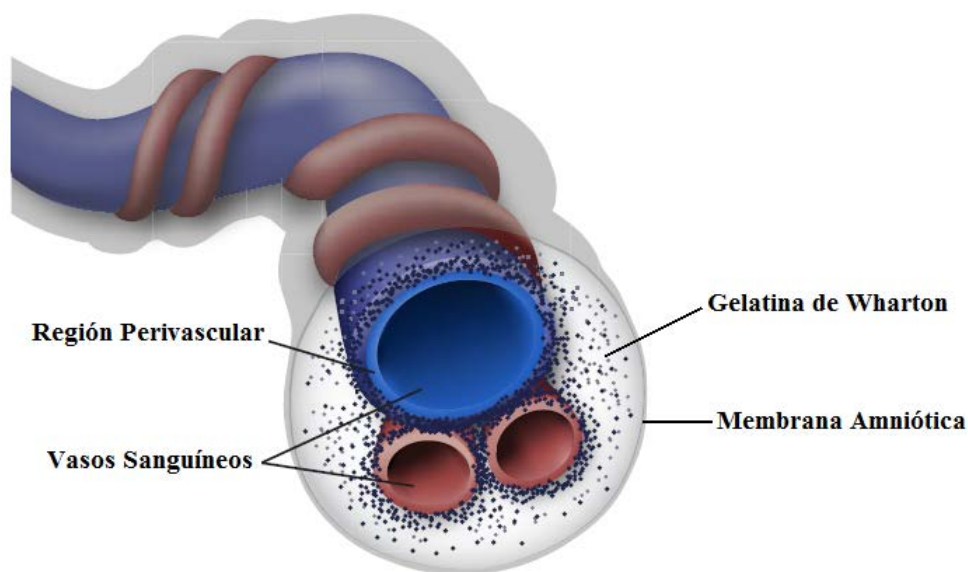


Figura 1. Sección transversal del cordón umbilical. El cordón umbilical está compuesto de adentro hacia afuera por dos arterias y una vena, todas ellas recubiertas por la región perivascular. Rodeando esta región se encuentra la gelatina de Wharton y por encima de esta gelatina, se sitúa la membrana amniótica. Modificada de Gauthier-Fisher et al., 2020.

De todas ellas, la gelatina de Wharton se ha convertido en una de las fuentes de MSC preferidas, debido que presentan un CFU-F mayor, al igual que un mayor potencial proliferativo y mayor actividad telomerasa, tiempos de duplicación más cortos y tiempos de

senescencia más largos comparados con las ESC y células madre adultas que se diferencian a progenitores adipogénicos, osteogénicos y condrogénicos (Nejad et al., 2015). Solo las MSC de la gelatina de Wharton se caracterizan por un alto potencial de diferenciación y las poblaciones obtenidas son de mayor pureza en comparación con otras células como las del amnios o las perivasculares. Son la fuente más estable y homogénea de MSC de todos los tejidos del UC (Semenova et al., 2021). Además, la gelatina de Wharton se puede extraer fácilmente del cordón umbilical sin daños para el donante y reduciendo los desechos biológicos del parto. Las MSC derivadas de la gelatina de Wharton (WJ-MSC) pueden expresar marcadores de ESC como Oct4, Nanog, Sox2 y Klf4. Varios estudios han informado de la posibilidad de producir células similares a células germinales a partir de WJ-MSC. Estas células tienen un mismo origen que las células germinales primordiales durante la embriogénesis y se desarrollan a partir del epiblasto proximal (Zolfaghar et al., 2020). A pesar de esto, diferentes informes consideran que estas células no se diferencian *in vivo* a células germinales (Mohamed et al., 2019).

Hipótesis y objetivos

Las MSC podrían ser una opción para el tratamiento de la infertilidad y de enfermedades relacionadas con la misma. Por ello el objetivo de esta revisión es estudiar la eficacia de las MSC y especialmente, aquellas derivadas del cordón umbilical, para realizar terapia celular.

Objetivos:

- Caracterizar las funciones de las MSC y su impacto en la restauración de la fertilidad masculina y femenina.
- Estudiar la eficacia de las MSC derivadas del cordón en la creación de gametos *in vitro*.
- Determinar la eficacia de las MSC derivadas del cordón umbilical comparadas con otras células madre.

Metodología

Se realizó una revisión bibliográfica utilizando la herramienta de búsqueda PubMed. Se emplearon las palabras clave y los términos de búsqueda (*mesenchymal stem cell AND male infertility*) OR (*mesenchymal stem cell AND female infertility*) OR (*mesenchymal stem cell AND infertility AND cell therapy*) OR (*MSC AND umbilical cord AND infertility*) OR (*UC-MSC AND gametogenesis AND in vitro gametes*). Se excluyeron las publicaciones que no fueran en inglés, las anteriores al año 2014, los resúmenes no publicados como manuscritos completos, artículos sobre la terapia con MSC para enfermedades que no tuvieran que ver con la fertilidad y trabajos con células madre distintas a las MSC. Además, se añadieron otros estudios ajenos al proceso de búsqueda debido a su relevancia y fueron seleccionados tras una búsqueda por palabras clave como: *infertility, in vitro gametes, ESC, iPSC y MSC*.

MSC e infertilidad

Las MSC debido a sus características se están convirtiendo en el elemento principal de la medicina regenerativa y la terapia celular (Mohamed et al., 2019). En particular las células derivadas del cordón umbilical al ser su obtención menos invasiva y presentar mejores tasas que otras fuentes de MSC. Actualmente hay numerosos estudios que investigan específicamente la seguridad y eficacia de las UC-MSC para tratar diferentes enfermedades, entre las que se encuentran los problemas reproductivos (Gauthier-Fisher., 2020).

- Obtención de las MSC

Los cordones umbilicales se obtuvieron en la mayoría de los estudios de recién nacidos sanos a término y por cesárea. Primero se enjuagaron los cordones con solución salina y se cortaron en trozos. En los cordones de los que se quieren obtener específicamente WJ-MSC, se les extrajo manualmente las células sanguíneas, las arterias, las venas y la membrana amniótica, la gelatina de Wharton restante se diseccionó en fragmentos pequeños o explantes.

Estos explantes los cultivaron en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal, penicilina/estreptomicina, L-glutamina y anfotericina B o β mercaptoetanol y se dejaron en una incubadora a 37°C al 5% de CO₂ para permitir la migración de las células. La fracción celular adherente se separó con tripsina EDTA y se volvieron a cultivar.

Finalmente, estas células se resuspendieron con PBS y se incubaron con anticuerpos propios de las MSC (CD73, CD105 o CD90) a 4°C en oscuridad, posteriormente se lavaron en PBS, se centrifugaron y se resuspendieron para analizarlas en un citómetro de flujo (Nejad et al., 2015; Asgari et al., 2017; Dissanayake et al 2018; Zolfaghar et al., 2020).

- **MSC y la infertilidad masculina**

Entre las diferentes causas de la infertilidad masculina, la azoospermia representa más del 20% de los casos (Badawi et al., 2020).

La azoospermia se clasifica como obstructiva (OA) y no obstructiva (NOA). Mediante un estudio de diagnóstico que incluye antecedentes, niveles hormonales y examen físico es posible determinar el tipo de azoospermia. Esto es importante, ya que la OA es más favorable debido a la preservación de la espermatogénesis. Sin embargo, la NOA representa aproximadamente el 10% de los casos de infertilidad y se manifiesta como la ausencia de espermatozoides en los eyaculados debido a la deficiencia espermatogénica. En la inmensa mayoría de los casos, la azoospermia se asocia con una serie de trastornos irreversibles de los testículos, que conducen a la inhibición de la espermatogénesis. Estos trastornos suelen estar relacionados con enfermedades endocrinas, genéticas e inflamatorias. Además, la NOA puede ser idiopática. (Zhankina et al., 2021). En la mayoría de los pacientes con NOA, la FSH se encuentra aumentada y la LH está elevada o cerca de lo normal. El hipogonadismo se define por niveles bajos de testosterona total y ocurre en la mayoría de los pacientes con NOA, reflejando generalmente una deficiencia de células de Leydig. La obesidad puede asociarse con niveles bajos de testosterona total, por lo que los niveles séricos de estradiol aumentan debido a la aromatización de andrógenos en los tejidos periféricos (Zhankina et al., 2021).

La aplicación de técnicas de reproducción asistida en varones azoospermicos es prácticamente imposible y por tanto, no aportan soluciones satisfactorias para la infertilidad masculina (Badawi et al., 2020). Sin embargo, hay diferentes estudios que demuestran que el trasplante de MSC podría inducir la espermatogénesis en pacientes azoospermicos. Yang y colaboradores observaron que el trasplante de UC-MSC en el compartimento intersticial de los testículos en ratones tratados con busulfán, producía una mayor expresión de genes relacionados con la espermatogénesis, para ello, inyectaron UC-MSC humanas en el espacio intersticial de un testículo de 10 ratones tratados con busulfán mientras el otro testículo permaneció sin inyectar (en el grupo de ratones control, inyectaron una solución salina). Después de tres semanas se analizó la expresión de diez genes relacionados con la meiosis asociados a las células germinales mediante RT-qPCR, donde observaron un aumento en su expresión (Yang et al., 2014). El grupo de Chen demostró que el trasplante de UC-MSC en túbulos seminíferos de ratones inmunodeficientes conducía a la diferenciación de espermatozoides. Para evaluar este potencial, microinyectaron UC-MSC humanas en la luz de los túbulos seminíferos de ratones inmunocompetentes tratados con busulfán. Estas células fueron marcadas con bromodesoxiuridina para su seguimiento, esto les permitió ver que las

células sobrevivieron al menos 120 días y exhibían una morfología típica de las células germinales, que migraban a la región basal del túbulo y posteriormente regresaban al compartimento luminal. Mediante inmunohistoquímica observaron la expresión de marcadores de células germinales. Además, observaron que los túbulos trasplantados mejoraban sus características morfológicas e histológicas (Chen et al., 2015). Unos años más tarde Abd Allah y colaboradores llegaron a las mismas conclusiones que el grupo de Chen y demostraron que las UC-MSc tenían un buen resultado en el tratamiento de la azoospermia mejorando la síntesis de espermatozoides. Llegaron a estas conclusiones después de aislar MSC de la sangre del UC, posteriormente las inyectaron localmente en los testículos de ratones azoospermicos a la quinta semana tras el tratamiento con busulfán. Formaron cinco grupos de ratones, el grupo 1 con ratones control a los que inyectaban PBS. El 2 con ratones tratados con busulfán. El 3 tratados con busulfán y MSC. El 4 tratados con busulfán y células madre hematopoyéticas y el 5 tratados con busulfán y una monocapa celular. Al finalizar el estudio se observó un aumento en los niveles de mRNA de genes relacionados con la meiosis y una disminución significativa de los niveles de FSH y LH en el grupo 3 de ratones en comparación con los grupos control y también observaron que los túbulos restauraron su morfología normal. La inyección de células madre hematopoyéticas y una monocapa celular (grupos 4 y 5) no mostraron cambios hormonales significativos y los túbulos tampoco mejoraron (Abd Allah et al., 2017).

- **MSC y la infertilidad femenina**

Entre las enfermedades relacionadas con la disfunción de la ovulación, una de las más importantes que afecta a la fertilidad femenina es el POF.

El POF es un desorden heterogéneo definido como el cese de la función ovárica y es clasificado por la OMS como un hipogonadismo hipergonadotrópico, es decir, niveles de FSH mayores a 40 IU/L evaluados en periodos separados de al menos 4 semanas, una disminución de los niveles de estradiol, además de 4 a 6 meses de amenorrea en mujeres menores de 40 años (Song et al., 2016; Mohamed et al., 2019). El POF representa una menopausia prematura y es una enfermedad misteriosa y complicada. Los mecanismos más importantes del POF son la disfunción folicular y el agotamiento de los folículos (Yoon, 2019).

En el 70% de los casos, no se suele identificar una sola causa que lo produzca. Se han encontrado numerosos factores incluidos, factores genéticos, autoinmunes y en el caso de las pacientes con el cáncer los tratamientos como la quimio/radioterapia o cirugía pueden producir problemas de salud, entre ellos el POF, lo que puede conducir a la infertilidad a largo

plazo. Aunque en muchos casos, la causa sigue siendo desconocida (Kadam et al., 2017; Mohamed et al., 2019).

Song y colaboradores trasplantaron UC-MSc humanas (por vía intravenosa en la cola de ratones y directamente en los ovarios) derivadas de un bebé varón en los ovarios de una rata con POF y las rastrearon mediante hibridación *in situ* con fluorescencia utilizando el cromosoma Y como marcador. Las UC-MSc restauraron el equilibrio hormonal, estimularon la foliculogénesis y redujeron la apoptosis de las células ováricas. En este estudio las UC-MSc trasplantadas residían en tejido ovárico y sobrevivieron durante al menos ocho semanas y observaron un aumento significativo en los folículos secundarios en los individuos trasplantados además de la reducción de la apoptosis. Sin embargo, no observaron cambios en el número de folículos primordiales, primarios ni antrales (Song et al., 2016). Más recientemente el grupo de Mohamed administró intra-peritonealmente UC-MSc a ratones previamente tratados con busulfán y ciclofosfamida y compararon los resultados con ratones control y con otros ratones tratados con los fármacos pero a los que se les inyectó suero salino. Analizaron los niveles hormonales en suero de los ratones y realizaron inmunohistoquímicas en muestras de tejido ovárico. Observaron un número mayor de folículos, una disminución de los niveles de FSH y un aumento notable de AMH en los ratones trasplantados en comparación con los ratones placebo tratados con quimioterapia. La inmunohistoquímica validó una mayor expresión de AMH y receptores de FSH. Posteriormente los ratones se aparearon y los trasplantados mostraron niveles de apareamiento altos (Mohamed et al., 2019). Las MSc tienen el potencial de tratar el POF y restaurar la fertilidad femenina. Aunque el conocimiento de la diferenciación directa de las MSc en ovocitos funcionales sigue siendo incompleto a nivel bibliográfico, el papel de las MSc en la restauración del nicho celular dañado parece innegable (Kadam et al., 2017). Según las diferentes investigaciones, Las MSc podrían promover la recuperación de la función ovárica mediante la inhibición de la apoptosis de las células de la granulosa y la atresia folicular mediante la regulación positiva de la expresión de los receptores de AMH y FSH en las células de la granulosa mejorando el nicho ovárico, pero otras investigaciones respaldan que se podría inducir a las células trasplantadas a diferenciarse a células de tejido ovárico (Yoon, 2019).

Eficacia de las MSC derivadas del cordón en la creación de gametos *in vitro*

La derivación eficiente a células germinales de diferentes fuentes de células madre *in vitro* ha sido un desafío en el tratamiento de la infertilidad. Diferentes investigaciones han intentado producir células germinales *in vitro* induciendo diferentes fuentes de células madre, principalmente iPSC y ESC, para el trasplante de células germinales (Nejad et al., 2015). La producción de estas células tiene décadas de historia, sin embargo, falta un modelo estándar de inductores apropiados para producirlas *in vitro* (Mohamed et al., 2019).

Se puede utilizar una combinación de factores de crecimiento, compuestos químicos, manipulación genética y/o co-cultivo con otras células para inducir la diferenciación de las MSC en células germinales masculinas o femeninas (Zhankina et al., 2021).

Las células germinales *in vitro* son una herramienta muy útil para comprender los mecanismos moleculares y celulares de la infertilidad, para establecer enfoques terapéuticos para la infertilidad y para proporcionar sistemas de pruebas para valorar los efectos toxicológicos de los medicamentos en las células germinales humanas (Nejad et al., 2015).

- Gametos *in vitro* masculinos

En el caso de la diferenciación a células germinales masculinas, el grupo de Majidi estudió el ratio de diferenciación de las UC-MSC humanas en un co-cultivo con células testiculares de ratón. Después de aislar las MSC mediante citometría, cultivaron las células en cuatro grupos diferentes: control; en co-cultivo con las células testiculares; en co-cultivo hasta día 5 y otro grupo en co-cultivo hasta día 10. Finalmente evaluaron la expresión de ciertos genes relacionados con la espermatogénesis mediante RT-qPCR y observaron una disminución de la expresión del marcador de pluripotencia OCT4 y un aumento de Fragilis, VASA y SYCP3 que son marcadores relacionados con las células germinales, este último se observó en co-cultivo hasta día 5 y 10. Con estos resultados demostraron que las UC-MSC en co-cultivo se diferenciaban a células germinales masculinas al reducirse la expresión de marcadores de pluripotencia y aumentar los marcadores de células germinales (Majidi et al., 2020). Unos años antes y de forma más específicamente, Nejad y colaboradores demostraron que las WJ-MSC humanas tienen la capacidad de diferenciarse a células germinales masculinas en las condiciones adecuadas. Aislaron WJ-MSC humanas y las trataron con ácido retinoico, con BMP4 o se cultivaron junto con células placentarias. Después de tres semanas estudiaron la expresión de marcadores de células germinales como Fragilis mediante RT-PCR y además de estudiar los marcadores de superficie realizando inmunocitoquímica. Con este experimento concluyeron que tanto el ácido retinoico junto con BMP4 y el ácido retinoico con el co-

cultivo son capaces de diferenciar las WJ-MSC a células parecidas a las germinales al aumentar la expresión de los marcadores de célula germinal pero, para llegar a una correcta diferenciación *in vitro*, el proceso de inducción con ácido retinoico debe de estar seguido de un soporte con BMP4 o un co-cultivo con células placentarias (Nejad et al., 2015). Más recientemente, Dissanayake y colaboradores diferenciaron WJ-MSC humanas a células germinales postmeióticas mediante un sistema de dos pasos utilizando ácido retinoico y medio acondicionado con células de Sertoli. Para ello, las WJ-MSC se indujeron con medio de diferenciación que contenía ácido retinoico durante dos semanas y, posteriormente con medio acondicionado de células de Sertoli tres semanas más. Finalmente analizaron la expresión génica de marcadores de pluripotencia (*Oct4*) en los que observaron una disminución y también analizaron marcadores relacionados con la meiosis (*Stra8*) que se regularon positivamente. Realizaron un estudio morfológico donde aproximadamente el 5% de las células eran espermatoцитos secundarios que habían formado el acrosoma y células similares a espermátidas que habían desarrollado inicialmente la cola (Dissanayake et al., 2018). Sin embargo, aunque consiguieron células haploides, la eficiencia del proceso durante la espermiogénesis fue muy baja.

- **Gametos *in vitro* femeninos**

En cuanto a la diferenciación a células germinales femeninas, Zolfaghar y colaboradores demostraron que las WJ-MSC humanas pueden diferenciarse a células similares a los ovocitos utilizando líquido folicular y medio acondicionado con células del cúmulo, teniendo el líquido folicular un impacto mayor en el proceso al observar un mayor tamaño celular y una mayor expresión de genes y proteínas específicas de células germinales (como VASA y SYCP3) y de ovocitos (GDF-9). Además, observaron que estas células WJ-MSC podrían expresar genes relacionados con las células germinales a niveles bajos cuando no hay inducción, mientras que aumentaría cuando se produce la inducción. Esto demostraría que las WJ-MSC humanas tienen la capacidad intrínseca de diferenciarse a células germinales femeninas. Para obtener estos resultados, el grupo de Zolfaghar cultivó las WJ-MSC en dos medios de inducción diferentes (un grupo con 10% de líquido folicular en el medio y otro grupo con 10% de células del cúmulo, además de un tercer grupo control con medio sin líquido folicular ni células del cúmulo) durante 21 días. Evaluaron los cambios morfológicos y la expresión de genes relacionados con las células germinales mediante RT-qPCR a los 0, 7, 14 y 21 días de cultivo. Además el último día de cultivo estudiaron la expresión de las proteínas específicas de ovocitos y células germinales con inmunofluorescencia. (Zolfaghar et al., 2020). Unos

años antes, el grupo de Asgari también demostró que las WJ-MSCs humanas pueden diferenciarse a células de la línea germinal femenina y además, que las células obtenidas de cordón umbilical masculino y femenino tienen la misma capacidad para diferenciarse en células de la línea germinal femenina, cuando se las induce con BMP4. Llegaron a estas conclusiones tras aislar WJ-MSCs humanas y cultivarlas en presencia de BMP4 durante 21 días. Durante este tiempo observaron las células en busca de cambios morfológicos y realizaron estudios de inmunocitoquímica y RT-qPCR para analizar la expresión de genes relacionados con células de la línea germinal como *Oct4* y *Ddx4* y el gen *Gdf9* que está relacionado con los ovocitos, donde observaron un aumento de la expresión de estos genes tras el cultivo con BMP4, lo que estaba en consonancia con un estudio anterior en el que realizaban un co-cultivo de MSC con células placentarias (Asgari et al., 2017).

Células madre con potencial para formar gametos *in vitro*

Además de las MSC, hay otras células madre que pueden utilizarse para la creación de gametos *in vitro* y para terapia celular.

Las ESC desempeñan un papel importante en medicina regenerativa debido a su capacidad de autorrenovación indefinida, su capacidad para diferenciarse en cualquier célula de los tres linajes y su capacidad para mantener el cariotipo normal. Además, se ha documentado que las ESC humanas pueden diferenciarse en células germinales *in vitro*, sufrir meiosis y formar gametos tanto masculinos como femeninos. Sin embargo, debido a preocupaciones éticas, incluso después de la derivación inicial, no se usa con tanta frecuencia en terapia celular (Saha et al., 2021).

Las iPSC son mejores que las ESC en medicina regenerativa porque se originan a partir de células adultas, lo que evita los problemas éticos de utilizar embriones. Además, las iPSC se desarrollan a partir de las propias células somáticas, y por lo tanto, hay menos posibilidades de rechazo inmunológico. A pesar de los resultados prometedores obtenidos a partir de modelos experimentales, la potencialidad teratogénica de las iPSC resultante de la reprogramación por inducción con oncogenes restringe su aplicación clínica hacia la terapia celular personalizada. Además del silenciamiento de genes y la inestabilidad genómica (Saha et al., 2021). Las iPSC tienen la capacidad de diferenciarse directamente en células postmeióticas similares a espermátidas sin manipulación genética, pero no en espermatogonias, espermátidas haploides o espermátidas en condiciones *in vitro*. El estudio *in vivo* de estas células mostró que pueden diferenciarse en células similares a espermatogonias y células similares a espermátidas pero sin la presencia de genes

relacionados con la meiosis o la espermatogénesis. Las MSC son superiores a las iPSC, ya que producen la expresión de genes relacionados con la meiosis y la espermatogénesis (como VASA y SCP3) más la producción de espermatozoides maduros (Abd Allah et al., 2017).

Entre las células madre adultas con la capacidad de desarrollar células germinales se encuentran células madre espermatogoniales (SSC) y células madre ováricas (OSC). Los testículos o los ovarios de las personas infértiles todavía contienen SSC u OSC, y estas células precursoras pueden proliferar y diferenciarse *in vitro* y pueden desempeñar un papel en las tecnologías de reproducción asistida (Goszczynski et al., 2019).

En cuanto a las SSC, la inyección de estas células junto con células germinales de donantes en los túbulos seminíferos de sujetos infértiles se utiliza para estudiar y restablecer la espermatogénesis en sujetos infértiles (Kadam et al., 2017). Otra de las opciones es el aislamiento, expansión y autotrasplante de las SSC (Gauthier-Fisher et al., 2019). La propagación *in vitro* de las SSC para la realización de estas técnicas se demostró con la secreción de factores como EGF y FGF por parte de las células somáticas de testículo en ratón. Sin embargo, los experimentos llevados a cabo en primates humanos y no humanos no consiguieron los niveles esperados de SSC (Zhang et al., 2020). En los modelos animales en los que se han realizado el trasplante de SSC la eficacia ha sido baja, en el caso de ratones la eficacia de la restauración de la fertilidad se sitúa en el 12% y esto podría deberse a que el nicho celular se encuentra dañado (Kadam et al., 2017). A pesar de ello, algunos grupos han conseguido espermatozoides funcionales en monos a partir de trasplantes autólogos de SSC (Saha et al., 2021). Se ha hipotetizado que el trasplante conjunto de las SSC con MSC podría mejorar la eficacia debido a la influencia de los factores paracrinos secretados por las MSC que estimularían la recuperación del nicho de las SSC y crear un entorno propicio para la restauración de la espermatogénesis (Kadam et al., 2017). De demostrarse haría necesaria la participación de las MSC al no poder restaurar las SSC por sí mismas la fertilidad.

Sin embargo, el trasplante de SSC no se ha podido realizar en humanos debido a la dificultad de identificarlas en testículos, la falta de un cultivo adecuado, de un protocolo de conservación y por posibles problemas de seguridad para los receptores tras el trasplante (Saha et al., 2021).

En el caso de las OSC, su existencia aún está en disputa, a pesar de ello. Hay estudios que han conseguido generar ovocitos o células similares de ovocitos a partir de las OSC (Zhang et al., 2020). Se aislaron las OSC de ratones de avanzada edad y se trasplantaron en el ovario de ratones jóvenes, posteriormente observaron que tenía lugar la foliculogénesis (Saha et al., 2021). En otro estudio se marcaron las OSC y se inyectaron en ovario, donde obtuvieron

ovocitos marcados que posteriormente se fecundaron *in vitro* y se llevaron a cultivo embrionario mostrando el marcador hasta la etapa de blastocisto (Silvestris et al., 2019). Al igual que en el caso de las SSC, el nicho celular también juega un papel importante para la activación y diferenciación de las OSC en el ovario y el estado del nicho celular es específica de especie ya que el entorno del nicho sería fundamental para la formación de los folículos (Goszczyński et al., 2019; Zhang et al., 2020). La mayor dificultad de emplear estas células en humanos es la dificultad para identificarlas, se encuentran en una proporción tan baja que algunos autores aún ponen en duda su existencia.

Discusión

La obtención de células madre para producir células germinales o para terapia celular se ha considerado, en los últimos años, una solución muy prometedora para tratar los problemas de fertilidad (Zolfaghar et al., 2020). De todas ellas, las MSC se han convertido en el tipo de células más eficaz en las aplicaciones clínicas de estas terapias, sobre todo aquellas que se encuentran los tejidos perinatales como el cordón umbilical y la gelatina de Wharton. La gelatina de Wharton se ha convertido en una de las fuentes de MSC preferidas debido a las características específicas que presentan las WJ-MS (Nejad et al., 2015). Además, varios estudios han informado de la posibilidad de producir células similares a células germinales a partir de estas células y las UC-MS se han empleado para tratar enfermedades asociadas a la infertilidad con resultados positivos.

El trasplante de UC-MS es un tratamiento con un gran potencial para restaurar la fertilidad en varones azoospermicos. Dos estudios mostraron un aumento en la expresión de genes relacionados con la meiosis tras el trasplante de UC-MS en testículos de ratones con azoospermia inducida por busulfán (Yang et al., 2014; Abd Allah et al., 2017). En otro estudio bajo condiciones similares, los autores marcaron y observaron las UC-MS para observar los cambios morfológicos que sufrían y analizar la expresión de marcadores típicos de espermatozoides (Chen et al., 2015). El resultado obtenido de estos estudios también se basó en la eficacia de estas células para la recuperación de la morfología normal de los túbulos seminíferos.

Por tanto, las MSC trasplantadas en los testículos de modelos animales de NOA mostraron una inducción de la espermatogénesis abriendo la posibilidad de utilizar la terapia con MSC en humanos. Sin embargo, el mecanismo por el cual estas células actuarían sigue sin estar completamente claro, los grupos de Yang y Abd Allah argumentan que el cambio en el nicho testicular tras el trasplante cambiaría y reduciría el potencial de diferenciación de las MSC. Es decir, las MSC mejorarían la espermatogénesis liberando factores de crecimiento. Por el contrario, los resultados obtenidos por Chen y colaboradores son consistentes con una diferenciación de las MSC a células germinales. En estos estudios analizaron las diferencias en la morfología de los túbulos y la espermatogénesis mediante el análisis de los niveles hormonales y de expresión génica tanto antes como después del tratamiento pero no evaluaron si había una auténtica recuperación en el potencial reproductivo de los sujetos tratados. Se observa una recuperación del nicho celular pero no una gametogénesis completa y funcional.

En el caso de la restauración de la fertilidad en mujeres con POF tras el trasplante de MSC, los estudios analizados de los grupos de Song y Mohamed parecen tener más claro que las MSC intervienen desde el punto de vista metabólico gracias a la secreción de factores de crecimiento que reducen la apoptosis y promueven la foliculogénesis actuando sobre los niveles hormonales de FSH y AMH. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en los trabajos que estudiaron el efecto de las MSC sobre la espermatogénesis. Por consiguiente, las MSC serían una herramienta adecuada para el tratamiento de esta enfermedad y, en especial las células derivadas del cordón umbilical, ya que actuaría, a priori, directamente sobre el nicho celular e interviniendo en la mejora y mantenimiento de las estructuras celulares que intervienen en estos procesos, reduciendo la apoptosis y recuperando niveles hormonales normales.

A pesar de ese aparente desconocimiento de la diferenciación de las MSC a células germinales en condiciones *in vivo*, diferentes estudios han conseguido resultados prometedores al diferenciar las MSC derivadas de tejidos del cordón umbilical *in vitro*. En la mayoría de los estudios emplearon WJ-MSK para la generación de células germinales *in vitro* y solo en uno UC-MSK. En dos de los estudios se realizó un co-cultivo para evaluar la capacidad de diferenciación de las MSC en células germinales masculinas. Los resultados de estos dos estudios mostraron la diferenciación de UC-MSK y WJ-MSK en células germinales en co-cultivo con células testiculares de ratón o células placentarias respectivamente (Majidi et al., 2020; Nejad et al., 2015), en el caso del co-cultivo con células placentarias, las MSC deben estar previamente acondicionadas con ácido retinoico y aunque la expresión génica mostró en este caso la capacidad de las WJ-MSK para diferenciarse en células similares a gametos estas células no llegaron a ser haploides. En el resto de estudios emplearon factores de crecimiento o medios de cultivo acondicionados como ácido retinoico, BMP4, líquido folicular y medio acondicionado con células de Sertoli o células del cúmulo. Los resultados de estos estudios respaldan la capacidad de diferenciación de las WJ-MSK en células germinales. Parece que la relación que se produce entre las MSC y los factores de crecimiento son la causa de esta diferenciación a células germinales en condiciones *in vitro* y que el co-cultivo podría mejorar la secreción y aumentar la cantidad de factores que influirían en este proceso como puede deducirse a partir de los resultados del grupo de Nejad.

Se han empleado con anterioridad otras células diferentes a las MSC para obtener células germinales, como ESC e iPSC y a pesar de sus buenos resultados, la aplicación de estas células en humanos es controvertida debido a los conflictos éticos que provocan. La otra fuente alternativa de células son las SSC y OSC que podrían restaurar la espermatogénesis y

la foliculogénesis respectivamente. En el caso de las SSC el trasplante autólogo de estas células tiene una eficiencia bastante baja (Kadam et al., 2017). Algunos autores consideran que para hacer más efectivo este tratamiento las SSC no pueden actuar solas y dependería de la acción de las MSC al ser trasplantadas conjuntamente. En cuanto a las OSC se obtuvieron resultados similares y la participación de las MSC también podría ser necesaria para obtener resultados más satisfactorios. Estas células son muy prometedoras pero muestran grandes limitaciones que dificultan la posibilidad de emplearlas clínicamente, al menos exclusivamente.

Aunque se ha demostrado la capacidad de las MSC para diferenciarse a otros tipos celulares después de su trasplante y migración al tejido diana, ya que hay autores que consideran que las MSC al ser células madre tendrían la capacidad de diferenciarse *in vivo* en células germinales y que por tanto, ellas solas restaurarían la capacidad de formar gametos (Yoon, 2019). Hay otros estudios que determinan que el número de MSC diferenciadas no es suficiente para justificar las mejoras en la fertilidad (Zhao et al., 2019), y que las MSC debido a su capacidad para secretar factores de crecimiento intervendrían mejorando las condiciones del nicho celular (Kadam et al., 2017). Esto podría deberse a que para la gametogénesis necesita para su correcto funcionamiento un nicho celular sano, factores de crecimiento y la relación que se produce entre las células de los tejidos implicados. Debido a que una de sus principales características es la secreción de factores que intervienen en la reparación de tejidos, la primera vía de actuación de las MSC sea reparar el nicho celular o el mantenimiento de la producción de factores. Por este motivo no se observaría tan fácilmente la diferenciación a células germinales en condiciones *in vivo*. Lo que tendría como consecuencia que las MSC no podrían ser utilizadas ellas solas en terapia celular en aquellas personas con falta de progenitores de células germinales y que en el caso de la reinstauración de la gametogénesis, tendrían que trasplantarse junto con las SSC y las OSC. En el caso de la diferenciación *in vitro*, se ha demostrado que es posible en presencia de diferentes inductores pero aún no se ha encontrado una combinación específica capaz de producir esta diferenciación con una alta eficiencia.

Conclusiones

Las MSC tienen el potencial de convertirse en el componente central de la terapia celular para el tratamiento de la infertilidad. Entre ellas, las derivadas del cordón umbilical son las que presentan mayores ventajas debido a sus características y a su obtención, además de un mayor potencial a largo plazo al compararlas con otras MSC como las derivadas de médula ósea. Las MSC producen factores paracrinos que mejorarían el ambiente y el nicho celular mejorando sustancialmente el pronóstico de enfermedades como la azoospermia o el POF tras el trasplante de estas células in vivo. Los estudios in vitro demuestran la capacidad de estas células para diferenciarse a células germinales, lo que permitiría la recuperación de la gametogénesis en aquellos sujetos sin precursores de células germinales o para el estudio de la gametogénesis in vitro. Se han empleado otras fuentes celulares como las ESC y las iPSC para la diferenciación de los gametos pero las limitaciones éticas y en la capacidad de conseguir auténticos gametos han impedido su aplicación en humanos. En cuanto a las terapias con células madre espermatozonales y ováricas aún no hay evidencias suficientes pero el tratamiento conjunto con las MSC resulta prometedor para la recuperación de la fertilidad.

Bibliografia

Abd Allah SH, Pasha HF, Abdelrahman AA, Mazen NF. Molecular effect of human umbilical cord blood CD34-positive and CD34-negative stem cells and their conjugate in azoospermic mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017; **428**(1-2): 179–191.

Asgari HR, Akbari M, Yazdekhashti H, Rajabi Z, Navid S, Aliakbari F, et al. Comparison of human amniotic, chorionic, and umbilical cord multipotent mesenchymal stem cells regarding their capacity for differentiation toward female germ cells. *Cell Reprogram*. 2017; **19**(1): 44–53.

Badawy AA, El-Magd MA, AlSadrah SA, Alruwaili, MM. Altered expression of some miRNAs and their target genes following mesenchymal stem cell treatment in busulfan-induced azoospermic rats. *Gene*. 2020; **737**:144481.

Chang Z, Zhu H, Zhou X, Zhang Y, Jiang B, Li S, Chen L, et al. Mesenchymal stem cells in preclinical infertility cytottherapy: a retrospective review. *Stem Cells International*. 2021: 1-12.

Chen H, Tang Q-L, Wu X-Y, Xie L-C, Lin L-M, Ho G-Y, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Mol Med Report*. 2015; **12**(1): 819–828.

Dissanayake D, Patel H, Wijesinghe P. Differentiation of human male germ cells from Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Reprod. Med*. 2018; **45**(2): 75-81.

Fazeli Z, Abedindo A, Omrani MD, Ghaderian SMH. Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy for recovery of fertility: a systematic review. *Stem Cell Rev*. 2018; **14**(1): 1-12.

Gauthier-Fisher A, Kauffman A, Librach CL. Potential use of stem cells for fertility preservation. *Andrology*. 2020; **8**(4): 862–878.

Goszczynski DE, Denicol AC, Ross PJ. Gametes from stem cells: status and applications in animal reproduction. *Reprod Dom Anim*. 2019; **54**(4): 22-31.

Kadam P, Van Saen D, Goossens E. Can mesenchymal stem cells improve spermatogonial stem cell transplantation efficiency? *Andrology*. 2017; **5**(1): 2-9.

Majidi F, Bamehr H, Shalchian Z, Kouchakian M, Mohammadzadeh N, Khalili A. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cell into germ-like cell under effect of co-culture with testicular cell tissue. *Anat Histol Embryol*. 2020; **49**(3): 359-364-

Mohamed SA, Shalaby S, Brakta S, Elam L, Elsharoud A, Al-Hendy A. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells as an infertility treatment for chemotherapy induced premature ovarian insufficiency. *Biomedicines*. 2019; **7**(1):7.

Nejad NA, Amidi F, Hoseini MA, Nia KN, Habibi M, Kajbafzadeh AM, et al. Male germ-like cell differentiation potential of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in co-culture with human placenta cells in presence of BMP4 and retinoic acid. *Iran J Basic Med Sci.* 2015; **18**(4): 325–333.

Rady D, Abbass MMS, El-Rashidy AA, El Moshy S, et al. Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Prospect of Human Clinical Translation. *Stem Cells International.* 2020: 1–45.

Saha S, Roy P, Corbitt C, Kakar SS. Application of stem cell therapy for infertility. *Cells.* 2021; **10**(7): 1613.

Semenova E, Grudniak MP, Machaj EK, Bocian K, Chroscinska-Krawczyk M, Trochonowicz M, et al. Mesenchymal stromal ceells from different parts of umbilical cord: approach to comparison & characteristics. *Stem Cell Rev Rep.* 2021.

Silvestris E, D’Oronzo S, Cafforio P, Kardhashi A, Dellino M, Cormio G. In vitro generation of oocytes from ovarían stem cells (OSCs): in search of major evidence. *Int J Mol Sci.* 2019; **20**(24): 6225.

Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y, Gao L, Wang G, Liu Z, Li H. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *BioMed Res. Int.* 2016: 1-13.

Yang R-F, Liu T-H, Zhao K, Xiong C-L. Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. *Asian J Androl.* 2014; **16**(5): 698-704.

Yoon SY. Mesenchymal stem cells for restoration of ovarian function. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 2019; **46**(1): 1–7.

Zhankina R, Baghban N, Askarov M, Saipiyeva D, Ibragimov A, Kadirova B, Khoradmehr A, Nabipour I, Shirazi R, Zhanbyrbekuly U, Tamadon A. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes for restoration of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia: a systemic review. *Stem Cell Res. Ther.* 2021; **12**(1): 229.

Zhang P-Y, Fan Y, Tan T, Yu Y. Generation of Artificial Gamete and Embryo From Stem Cells in Reproductive Medicine. 2020; **8**: 781.

Zhao Y, Chen S, Su P, Huang F, Shi Y, Shi Q, Lin S. Using mesenchymal stem cells to treat female infertility: an update on female reproductive diseases. *Stem Cells International,* 2019: 1-10.

Zolfaghar M, Mirzaeian L, Beiki B, Naji T, Moini A, Eftekhari-Yazdi P, Akbarinejad V, Vernengo A. J, Fathi R. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells differentiate into oocyte like cells in vitro by follicular fluid and cumulus cells conditioned medium. *Heliyon*. 2020; **6**(10): e04992.