



Universidad de Sevilla

Facultad de Biología

GRADO EN BIOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Trabajo de revisión bibliográfica

CÉLULAS MADRES Y SU APLICACIÓN EN MEDICINA REPRODUCTIVA

Belén Hernández Moreno

Tutora: Cintia Checa Rodríguez

Departamento de Genética

Presentación: Junio de 2023

RESUMEN

La infertilidad es un problema que afecta a una fracción importante de la población. Existen numerosos métodos para tratarla, como las técnicas de reproducción asistida (TRA); sin embargo, todas las TRA requieren el uso de gametos por lo que parejas sin gametos funcionales solo pueden recurrir a la donación de gametos. En los últimos años el campo de las células madre, las cuales presentan la capacidad de autorregenerarse y diferenciarse en diversos tipos celulares especializadas, ha avanzado notablemente y numerosos esfuerzos se han llevado a cabo para su uso en medicina reproductiva. Aunque se han realizado muchos estudios en modelos animales donde se han generado gametos *in vitro* a partir de distintos tipos de células madre, aún no se han generado gametos humanos seguros por lo que se requiere más investigación. En este trabajo, resumimos los avances actuales del uso de células madre en el campo de la reproducción, centrándonos en su posible uso en la derivación de gametos.

Palabras clave: células madre, gametogénesis *in vitro*, gametos artificiales, medicina reproductiva, infertilidad.

ABSTRACT

Infertility affects a significant part of the population. There are many methods to treat these conditions, such as assisted reproductive techniques (ART); however, all ART require gametes, so couples without functional gametes can only resort to gamete donation. In recent years, the field of stem cells, which have the ability to self-regenerate and differentiate into various specialized cell types, has made remarkable advances and numerous efforts have been made to use them in reproductive medicine. Although many studies have been conducted in animal models where gametes have been generated *in vitro* from different stem cells, safe human gametes have not yet been generated and further research is required. Here, we summarize the current advances in the use of stem cells in reproduction, focussing on their potential use in gamete production.

Keywords: stem cells, *in vitro* gametogenesis, , artificial gametes, reproductive medicine, infertility.

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. CÉLULAS MADRE.....	2
3.1. Clasificación.....	4
3.1.1. Según su potencial de diferenciación.....	4
3.1.2. Según su origen.....	5
3.2. Inducción de pluripotencialidad en células diferenciadas.....	7
4. USO DE LAS CÉLULAS MADRE EN MEDICINA REPRODUCTIVA.....	9
4.1. Producción de gametos.....	10
4.1.1. Gametogénesis in vivo.....	10
4.1.2. Gametogénesis in vitro.....	13
4.2. Otros usos.....	18
5. CONCLUSIONES.....	19
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la infertilidad es un problema de salud mundial que afecta aproximadamente al 15% de las parejas en edad reproductiva. Se conoce como infertilidad a la incapacidad de reproducirse tras 12 meses en los que se mantienen relaciones sexuales sin medidas de protección anticonceptiva (Rojas et al., 2011). La mitad de las veces se debe a un factor femenino, el otro 50% de las veces a un factor masculino y en algunos casos se puede deber a una combinación de ambos, o incluso la causa puede ser inexplicable (Navarro, 2023). Los factores causales principales son: el factor masculino que recoge un conjunto de desórdenes seminales, y dentro del factor femenino: el factor tubárico y peritoneal que agrupa a las deformaciones y disfunciones de las trompas de Falopio y su entorno, la endometriosis y el factor ovulatorio que engloba los casos donde la ovulación se da de forma anormal (Ramirez et al., 2019).

La medicina reproductiva es una rama de la medicina especializada en diagnosticar y tratar la infertilidad y otros problemas reproductivos; es decir, salvaguardar la fecundidad (National Cancer Institute, 2016). Para cumplir con su propósito las personas que se dedican a ella usan diferentes estrategias con diverso grado de invasión y coste que pueden usarse dependiendo de la causa de la infertilidad.

Las variaciones en la forma de vida, el uso de medicamentos y la aplicación de hormonas vía inyección pueden ser diferentes opciones para promover la ovulación (Jin, 2015). Sin embargo, hay algunos pacientes que no pueden procrear de forma natural y necesitan las técnicas de reproducción asistida (TRA) que favorecen o sustituyen los procesos biológicos que ocurren durante la reproducción humana (Solís, 2000), y ayudan o reemplazan a los órganos reproductores en los cometidos para los que son ineficaces por degeneración o inexistencia (Nuñez, 2022). Estas técnicas se pueden clasificar en intracorpóreas o extracorpóreas. En las TRA intracorpóreas la fecundación del ovocito se realiza dentro del aparato reproductor femenino, el ejemplo más característico es la inseminación artificial. Por otro lado, en las TRA extracorpóreas el óvulo es fecundado por los espermatozoides en el exterior mediante fecundación *in vitro* convencional (FIV) o microinyección espermática (ICSI) (Pérez, 2015) con la finalidad de conseguir embriones de la mayor calidad posible que posteriormente son introducidos en el útero para que la probabilidad de lograr el embarazo aumente (Instituto Valenciano de Infertilidad, 2023).

En la actualidad, se han vencido muchos obstáculos relacionados con la fertilidad humana gracias a los avances realizados en biotecnología reproductiva y se han desarrollado nuevas TRA como el reemplazo mitocondrial (Lee & Kang, 2019).

En los últimos años el campo de las células madre ha estado en auge, convirtiéndose en una posible alternativa para el tratamiento de diversas patologías. Las células madre son células indiferenciadas con el potencial de convertirse en muchos tipos de células del cuerpo.

Los avances en medicina regenerativa, el uso de células autólogas (células madre del propio paciente) maduras como base para las terapias celulares y el progreso en ingeniería de tejidos, en la primera década del siglo XXI, se tomaron como incentivos para pensar en la posibilidad de crear células germinales partiendo de células madre con la finalidad de tratar algunos pacientes con infertilidad (Fabres, 2010). Para que esta técnica se pueda desarrollar es necesaria la haploidización de células somáticas, lo cual presenta muchas limitaciones como la memoria epigenética que determina la regulación de la expresión génica o la cantidad de ovocitos que son necesarios para el estudio del proceso de haploidización (Lee & Kang, 2019).

Además, existen numerosas líneas de investigación y ensayos preclínicos y clínicos con el objetivo de desarrollar nuevas terapias basadas en células madre para tratar problemas de infertilidad que no involucran gametos, como el daño endometrial, atrofia vaginal o disfunción eréctil, entre otros problemas del tracto reproductor (Saha et al., 2021).

2. OBJETIVOS

En vista del notable porcentaje de población con dificultades para conseguir descendencia propia, y los avances llevados a cabo en la investigación con células madre como vía potencial futura para el tratamiento de la infertilidad gracias a su capacidad de diferenciación y su fuente ilimitada, nos hemos propuesto llevar a cabo una revisión bibliográfica actualizada sobre la aplicación de células troncales en medicina reproductiva enfocándonos principalmente en la generación de gametos masculinos y femeninos.

3. CÉLULAS MADRE

Las células madre o troncales (SC, por sus siglas en inglés) son un conjunto de células de nuestro cuerpo que conservan la capacidad de autorrenovarse, gracias a la función de la telomerasa, y diferenciarse en diversos tipos celulares especializados y con ello dar lugar a diferentes tejidos y órganos (Hui et al., 2011; Mata-Miranda, 2013).

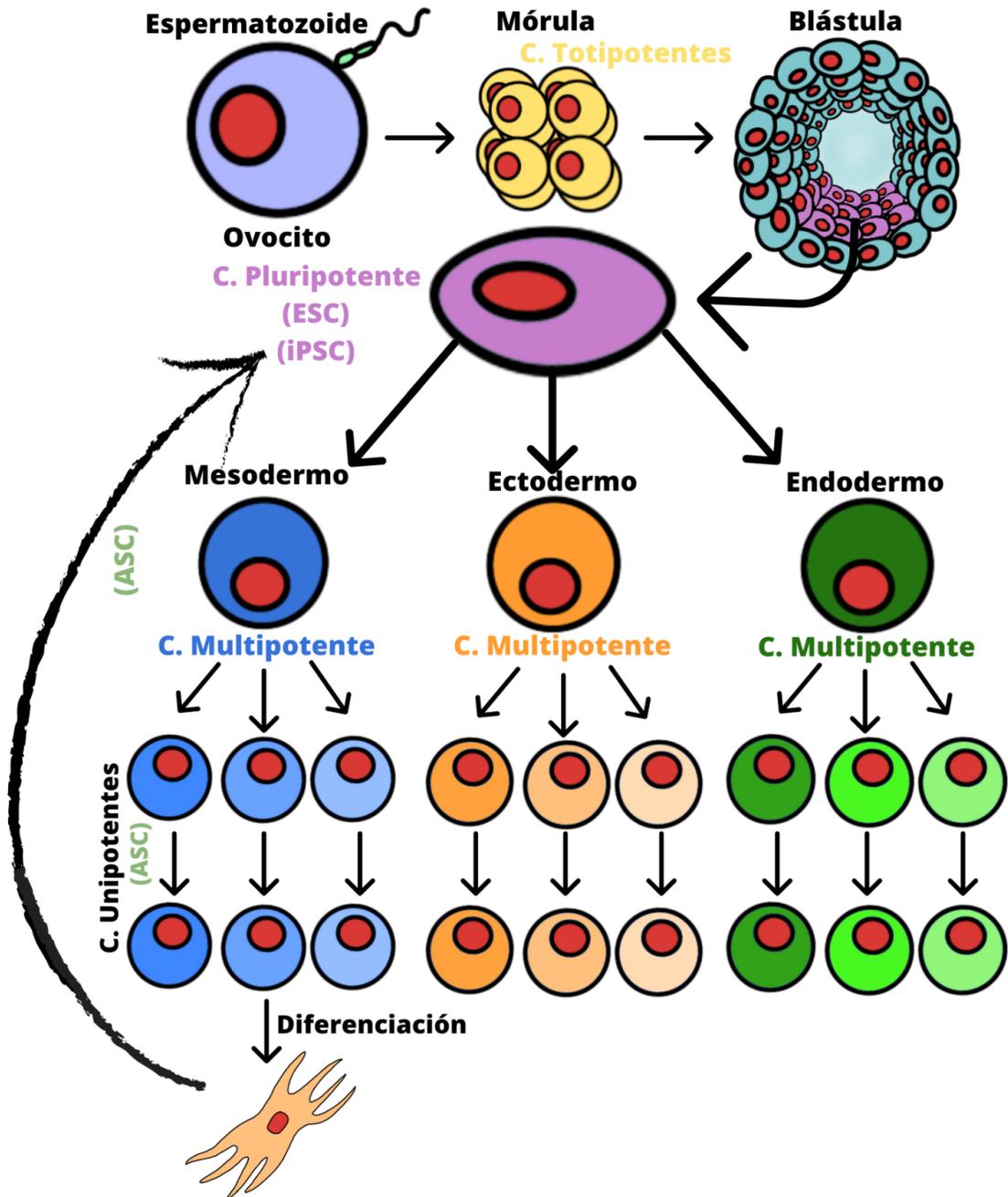


Figura 1. Clasificación de células madre.

Procedencia de los diferentes tipos de células madre y potencial de diferenciación que posee cada una de ellas. Tras la fecundación se forma un cigoto que posteriormente se convierte en mórula. Tanto el cigoto como las células de la mórula son totipotentes, por lo que tienen el potencial de crear un organismo completo. Tras varias divisiones se forma la blástula de donde derivan las células madre embrionarias (ESC), células pluripotentes que pueden diferenciarse en células de las tres capas embrionarias. A partir de las ESC se forman las células madre adultas (ASC), las cuales son multipotentes y pueden diferenciarse en múltiples tipos de células especializadas de su tejido de origen, o unipotentes si son capaces de generar un solo tipo de célula específica. A partir de células diferenciadas, se pueden obtener células pluripotentes artificiales conocidas como células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

3.1. Clasificación

Existen diferentes criterios en los que nos podemos basar para catalogar las células madre. Atendiendo a la capacidad de producir diferentes tipos celulares podemos distinguir tipos de células madre según su potencial de diferenciación; además, dependiendo de su procedencia desglosamos las células madre según su origen (Figura 1) (Pardo, 2005; Shah & Khan, 2021).

3.1.1. Según su potencial de diferenciación

❖ Totipotentes

Células capaces de proliferar y originar los diversos tipos de células diferenciadas de un organismo, así como generar los tejidos extraembrionarios. Son capaces de formar un organismo completo. El ejemplo más conocido es el cigoto (Figura 1) (Shah & Khan, 2021).

❖ Pluripotentes

Estas células presentan la posibilidad de producir cualquier tipo de célula corporal así sea somática o germinal; en otras palabras, puede diferenciarse en células de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo) (Figura 1). A pesar de ello, carecen de la capacidad de organizarse en un embrión por lo que no son suficientes para crear un individuo completo.

In vivo, la masa celular interna (ICM, por sus siglas en inglés) del embrión conserva, mediante la expresión de factores endógenos, algunas células madre pluripotentes que pueden extraerse indiferenciadas y crecer *in vitro* como células madre embrionarias (Shah & Khan, 2021).

❖ Multipotentes

Se conocen como células madre multipotentes o células órgano-específicas a aquellas que se han diferenciado en una de las tres capas germinales embrionarias y son capaces de originar varias células especializadas de su misma capa germinal, incluso pueden formar un órgano completo (Figura 1) (Pimentel & Murcia, 2017).

Las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) son el ejemplo más conocido de células multipotentes, proceden de diferentes tejidos como la sangre del cordón umbilical, el tejido adiposo o la médula ósea. El estudio de diversos investigadores declaró que este tipo celular es capaz de generar tejidos procedentes del

mesodermo; en la actualidad, se han obtenido células neuronales derivadas del ectodermo a partir de MSC (Shah & Khan, 2021).

❖ **Oligopotentes**

Células capaces de generar dos o más linajes de células en un tejido concreto y de autorregenerarse (Figura 1). La posibilidad de producir linajes linfoides y mieloides hacen que las células madre hematopoyéticas sean un ejemplo de células oligopotentes (Shah & Khan, 2021).

❖ **Unipotentes**

Las células madre unipotentes presentan una gran capacidad de autorrenovación y el potencial de diferenciación más reducido, es decir, solo pueden originar células de un solo linaje (Figura 1) (Shah & Khan, 2021).

Se corresponden con la mayoría de células madre que encontramos en un tejido que no ha sido alterado en su estructura básica, por ejemplo, las células satélites que al madurar dan lugar a células musculares cuando la regeneración muscular es necesaria (Valero et al., 2011; Shah & Khan, 2021).

3.1.2. Según su origen

❖ **Embrionarias**

Las células madre embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés) aparecen en las fases tempranas del desarrollo, formando parte de la masa celular interna del blastocisto, se encuentran en estado pluripotentes y pueden dar lugar a una de las tres capas germinales momento en el que se convierten en células multipotentes (Figura 1). Este tipo celular posee la capacidad de formar líneas celulares mientras se encuentren en estado pluripotencial; es decir, se pueden mantener en un estado original indiferenciado indefinidamente bajo unas condiciones concretas de cultivo (Pera et al., 2000; Shah & Khan, 2021).

❖ **Adultas**

Una vez finalizado el desarrollo embrionario algunas células se mantienen indiferenciadas con la finalidad de mantener los tejidos y órganos de un organismo, las llamadas células madre adultas (ASC, por sus siglas en inglés) (Figura 1). *In vivo* muestran un rango de diferenciación estrecho; sin embargo, presentan capacidad para

diferenciarse en tejidos de las diferentes capas germinales *in vitro* (Poulsom et al., 2002; Shah & Khan, 2021).

Las ASC se encuentran en varios tejidos del organismo adulto, incluida la médula ósea, sangre, cerebro, músculo, hígado, páncreas o gónadas entre otros. Las más estudiadas han sido las células madre hematopoyéticas, principalmente situadas en la médula ósea y dan lugar a las células sanguíneas; y las células mesenquimales, que pueden ser extraídas a partir de varias fuentes como el estroma de la médula ósea o los tejidos adiposos y se pueden diferenciar *in vivo* en células que pertenecen a los diferentes tejidos conjuntivos exceptuando a la sangre (Shah & Khan, 2021). Actualmente también se conoce la existencia de células madre adultas en las gónadas: las células madre espermatogoniales (SSC, por sus siglas en inglés) y las células madre ováricas (OSC, por sus siglas en inglés); el descubrimiento de estas últimas, las OSC, supuso un desafío al dogma establecido de que las mujeres nacen con un número determinado de células germinales que se fija antes o alrededor del momento del nacimiento (Goszczynski et al., 2019; Grieve et al., 2015). Estas células pluripotentes, situadas en la membrana basal del tubo seminífero y en los ovarios respectivamente, son las responsables de generar continuamente las espermatogonias en los individuos con aparato reproductor masculino o crecer y transformarse en células parecidas a ovocitos en individuos con aparato reproductor femenino (Moreno et al., 2015).

❖ **Fetales**

Se obtienen a partir de las 8 semanas de desarrollo, momento en el cual el embrión es considerado como feto, tras la interrupción intencionada de la gestación (Jaime et al., 2007). La extracción de las mismas se puede realizar desde los propios tejidos fetales, como la médula ósea o la sangre, o desde los tejidos extraembrionarios como la placenta o la sangre del cordón umbilical (Pimentel & Murcia, 2017; Shah & Khan, 2021). Son similares a las ASC, aunque presentan una mayor plasticidad en el potencial de diferenciación, así como un crecimiento superior en cultivo, lo que incrementa su potencial uso en medicina regenerativa (Dorin & Koh, 2011).

❖ **Pluripotentes inducidas**

Como resultado de los progresos acontecidos en los últimos 70 años, el desarrollo y perfeccionamiento de las tecnologías relacionadas con la reprogramación celular se ha

conseguido inducir pluripotencia a células somáticas obteniendo células madre similares a las ESC que fueron denominadas células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés) (Figura 1). La similitud de diferenciación con las ESC dan expectativas en el campo de la medicina regenerativa, así como en la producción de modelos de enfermedades *in vitro* (Shah & Khan, 2021).

3.2. Inducción de pluripotencialidad en células diferenciadas

Las ESC permiten la producción de células diferenciadas *in vitro* y pueden considerarse la fuente óptima de células pluripotentes para la medicina regenerativa gracias a su capacidad de autorrenovación y su pluripotencialidad; sin embargo, la obtención de este tipo de células troncales precisa de la destrucción de embriones humanos lo que genera un problema ético (Gazarian, 2011).

Por otra parte, las iPCS son una alternativa para los estudios en medicina reproductiva que no presentan tanta controversia ética. En 1992 Gurdon encontró la primera evidencia de la reversibilidad del proceso de diferenciación tras el trasplante del núcleo de una célula intestinal adulta de renacuajos de *Xenopus laevis* en huevos enucleados, lo que dio lugar a renacuajos normales (Gurdon, 1962). Más tarde, Yamanaka consiguió reprogramar células de ratón mediante la expresión de 4 factores que se conocen como factores de Yamanaka (OCT4, SOX2, C-MYC y KLF4) (Takahashi & Yamanaka, 2006) y numerosos estudios posteriores han ido estableciendo diversos protocolos de reprogramación.

Algunos autores estructuran el proceso de formación de iPCS en cuatro etapas (Figura 2):

I. Expresión de genes de reprogramación

La reprogramación de células somáticas humanas (siendo los fibroblastos las más usadas) que darán lugar a las iPSC requiere la expresión exógena intensa de *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y la cooperación prescindible de *C-MYC*, *LIN28* o *KFLA*, genes que funcionan como factores de transcripción en estadios muy tempranos del desarrollo y colaboran activando genes para conservar la capacidad de pluripotencia y autorrenovación características de las células madre y reprimiendo otros necesarios para la diferenciación de las células a alguna de las tres capas germinales (Figura 2) (Gazarian, 2011; Karagiannis et al., 2019; Swain et al., 2020).

Cuando empieza la expresión de los genes introducidos mediante un vector, en fibroblastos aislados, se inicia la activación endógena de genes de autorrenovación y algunas colonias de células comienzan a exponer en su superficie marcadores de pluripotencialidad y precisan de

factores de crecimiento característicos de ESC. En esta fase, las células pueden retornar a una forma diferenciada, sufrir apoptosis o pasar a un estado irreversible de reprogramación (Gazarian, 2011).

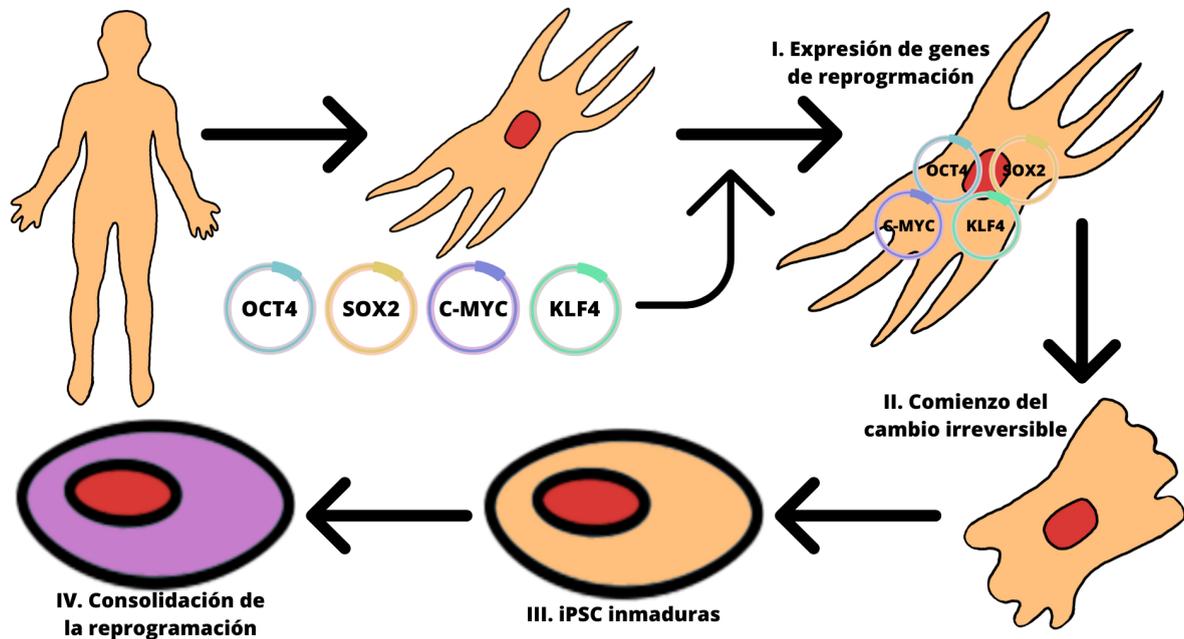


Figura 2. Etapas del proceso de formación de iPSC.

Fases del proceso de inducción de pluripotencialidad en células diferenciadas. Se extraen células somáticas diferenciadas del paciente y se induce la expresión exógena de los genes de reprogramación (*OCT4*, *SOX2*, *C-MYC* y *KLF4*), a continuación se observa el comienzo del cambio irreversible, posteriormente se pueden aislar iPSC inmaduras que finalmente consolidarán la reprogramación.

II. Comienzo del cambio irreversible

Menos del 0,1% de las colonias consiguen la dosis de expresión endógena necesaria de Nanog para superar el umbral y alcanzar la etapa irreversible (Figura 2). En esta fase, las células deberán reforzar la expresión de los genes de pluripotencialidad, activar el ciclo celular embrionario, característico de los estadios tempranos del desarrollo y desprenderse de los marcadores de diferenciación para llegar a la tercera etapa del proceso (Gazarian, 2011).

III. iPSC inmaduras

En esta etapa las iPSC comparten numerosas características con las ESC como la morfología tridimensional de las colonias, la expresión de los genes de pluripotencialidad, la elevada actividad de la telomerasa, un ciclo celular corto y la ausencia de proteínas de linaje específico; sin embargo, la eficiencia de reprogramación para alcanzar esta fase difiere

notablemente entre los diversos tipos celulares lo que supone que la desdiferenciación puede ser incompleta aun mostrando los marcadores de pluripotencialidad (Figura 2) (Gazarian, 2011).

IV. Consolidación de la reprogramación

La comparación entre iPSC y ESC muestra expresión diferencial de casi cuatro mil genes; no obstante, se ha observado que a diferencia de las iPSC tempranas las iPSC de etapas avanzadas disminuyen las diferencias con las ESC, lo que indica que las iPSC recién originadas necesitan seguir reprogramándose durante un tiempo para disminuir la memoria epigenética que mantiene, tras la reprogramación, la expresión de algunos marcadores de linaje específicos de los distintos de células (Figura 2) (Gazarian, 2011).

4. USO DE LAS CÉLULAS MADRE EN MEDICINA REPRODUCTIVA

En el campo de la reproducción, la aparición de las técnicas de reproducción asistida (TRA, por sus siglas en inglés) supuso una revolución en el tratamiento de la infertilidad. Desde el primer embarazo exitoso por fecundación *in vitro*, en 1978, estos tratamientos han experimentado un enorme avance. Sin embargo, todas las TRA precisan gametos, por lo que no pueden ayudar a parejas que carecen de gametos funcionales propios, siendo necesario, en este caso, la utilización de gametos de donantes como única solución.

El objetivo principal de las investigaciones con células madres ha sido conseguir diferenciarlas, *in vitro*, hacia otros tipos celulares con el fin de que puedan ser una fuente de reemplazo celular (Mata et al., 2013). En el ámbito de la medicina reproductiva, los avances en células madre y en medicina regenerativa abren camino para el desarrollo de nuevos métodos con el fin de resolver algunas de las patologías que causan infertilidad.

En particular, el uso de células madre pluripotentes para la formación de células germinales (Martin-Inaraja & Eguizabal, 2022) podría ser una alternativa al uso de gametos de donantes. Otros usos serían, por ejemplo, el empleo de células mesenquimales para tratar a mujeres con insuficiencia ovárica prematura (Zhao et al., 2019) o la generación de estructuras semejantes a embriones tempranos (blastocisto) a partir de un conjunto de diferentes tipos de células madre (Zhang et al., 2020). En esta revisión bibliográfica nos centraremos en la generación de gametos partiendo de células madre.

4.1. Producción de gametos

Existen diversas técnicas para tratar la infertilidad, como ya hemos comentado; no obstante, cuando la causa de infertilidad es una carencia en la producción de células germinales los tratamientos conocidos son insuficientes; por ello, las investigaciones en este campo se han centrado en el desarrollo de nuevos métodos que permitan tratar estos casos. Pongamos el caso de la formación de gametos partiendo de células troncales (Moore et al., 2008).

4.1.1. Gametogénesis *in vivo*

El proceso por el cual se generan los gametos se conoce como gametogénesis. En él una célula diploide realiza una meiosis y se originan un número determinado de células haploides que difiere dependiendo del sexo del individuo como veremos en los siguientes subapartados (Velásquez, 1994). Las células precursoras de la línea germinal se denominan células germinales primordiales (PGC, por sus siglas en inglés) y proceden del epiblasto, una capa de células embrionarias que aparece durante la gastrulación y da origen al mesodermo y ectodermo. En humanos, en la cuarta semana de desarrollo embrionario comienzan a determinarse las PGC y posteriormente migran hacia la cresta genital donde tendrá lugar su diferenciación (Figura 3) (Moreno, 2021).

❖ Gametos femeninos

Los gametos femeninos son los óvulos y el proceso por el cual se forman es conocido como ovogénesis o gametogénesis femenina.

Muy temprano en el desarrollo las PGC llegan a las gónadas femeninas donde se transforman en ovogonias las cuales comienzan a realizar una serie de divisiones mitóticas. Una vez finalizado el tercer mes de gestación, son rodeadas por las células epiteliales superficiales de las gónadas que se encontraban en proliferación y entran en meiosis, donde detienen el ciclo en Profase I generando los ovocitos primarios. La estructura formada por un ovocito primario junto a la capa de células epiteliales que lo rodea se conoce como folículo primordial. Los folículos primordiales se forman antes del nacimiento y se mantienen en Profase I hasta la pubertad donde continúa la foliculogénesis, es decir, el desarrollo de los folículos primordiales hasta su estadio final. Se llegan a formar hasta 7 millones de ovogonias, sin embargo, muchas mueren en el desarrollo embrionario llegando a encontrarse entre 1-2 millones de folículos primordiales en el momento del nacimiento. Posteriormente, desde el nacimiento hasta

el inicio del periodo fértil, la pubertad, este número sigue descendiendo hasta situarse en torno a 500.000 ovocitos (Arroyo et al., 2020; Virant-Klun, 2015).

Cuando se llega a la pubertad la hormona foliculoestimulante (FSH, por sus siglas en inglés) induce la maduración del folículo dando origen al folículo primario que posteriormente se transformará en folículo secundario, el cual al madurar, da lugar al folículo de Graaf. En este momento, justo antes de la ovulación, un aumento en la concentración de hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) provoca la reanudación de la meiosis en el ovocito primario que finaliza la Meiosis I generando dos células hijas de distinto tamaño: el primer corpúsculo polar, la de menor tamaño; y el oocito secundario, la célula con mayor parte del citoplasma. Este último comienza la Meiosis II deteniéndose en Metafase II, la cual sólo concluirá tras la fecundación liberando el segundo corpúsculo polar. Si no llega a producirse la fecundación, el ovocito secundario degenera (Figura 3a) (Arroyo et al., 2020; Virant-Klun, 2015).

❖ **Gametos masculinos**

Los espermatozoides son los gametos masculinos y el proceso por el cual se originan se conoce como espermatogénesis.

Al igual que en el caso de los gametos femeninos, se forman a partir de las PGC que se pueden identificar en torno a la tercera semana de desarrollo embrionario. Las PGC migran a las crestas gonadales donde comienzan a proliferar activamente y forman los gonocitos que entran en detención mitótica. Los gonocitos son los precursores de las células madre espermatogoniales (SSC, por sus siglas en inglés) y experimentan diferenciación sexual en los testículos para convertirse en SSC. Las SSC, también llamadas espermatogonias, son células madre adultas con la capacidad de autorrenovarse, así como de formar cuatro espermatozoides tras el proceso de espermatogénesis (Molfino & Figueroa, 2017; Zheng et al., 2014).

La espermatogénesis está dividida en tres fases: (I) Fase espermatogónica o proliferativa, donde las espermatogonias proliferan mediante mitosis tras la pubertad; (II) Fase espermatocítica o meiótica, las espermatogonias duplican su material genético transformándose en espermatoцитos primarios los cuales tras finalizar la Meiosis I se convierten en espermatoцитos secundarios que al concluir la Meiosis II forman las espermátidas; (III) Fase de maduración de las espermátidas, también llamado espermiogénesis, proceso por el cual se produce la diferenciación de las espermátidas a espermatozoides (Figura 3b) (Bassas, 2001; de la Fuente, 2015).

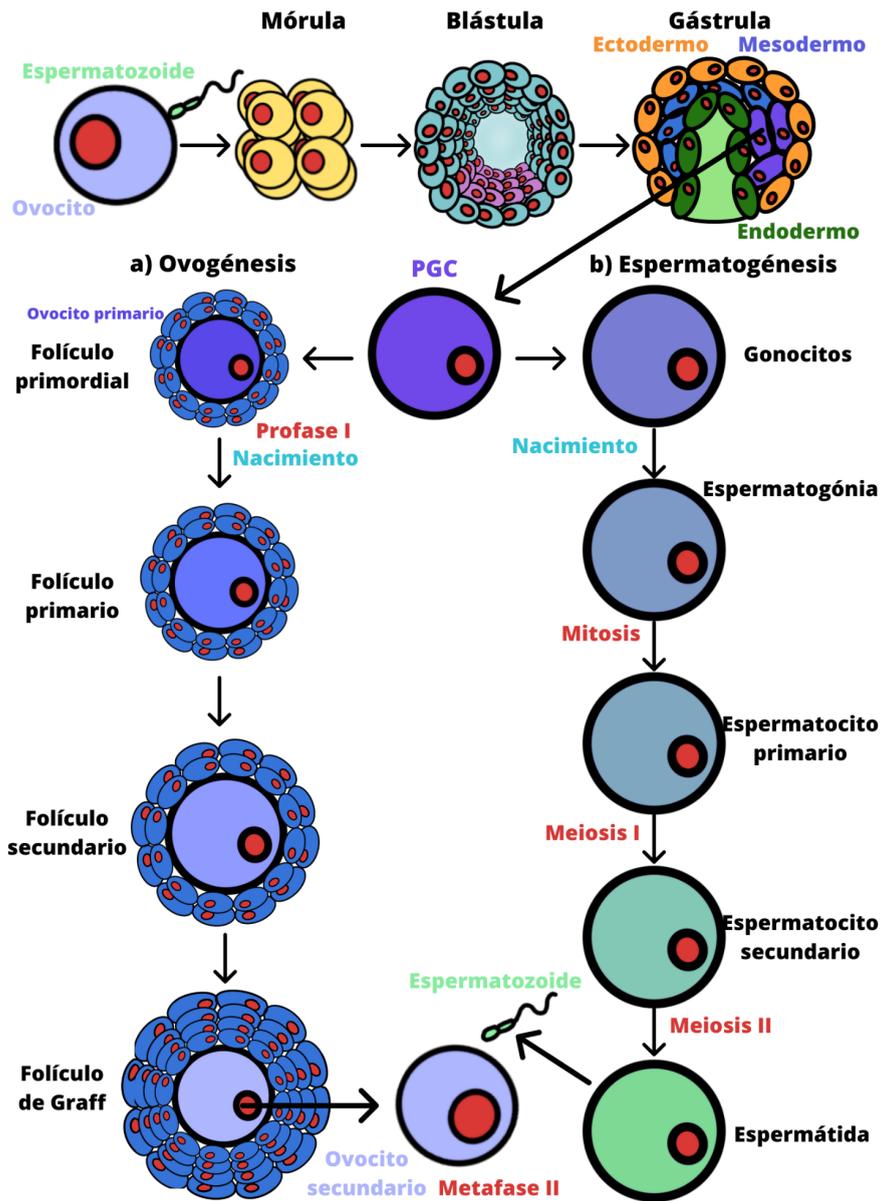


Figura 3. Gametogénesis.

Tras la fecundación se origina la mórula, más tarde la blástula y tras el proceso de gastrulación, la gástrula. En esta etapa aparecen las células germinales primordiales (PGC) precursoras de la línea germinal. **a) Ovogénesis.** Las PGC proliferan y se diferencian en ovocitos primarios los cuales se rodean de células epiteliales para formar los folículos primordiales que comienzan las Meiosis I y se detienen en Profase I. Tras la pubertad el folículo primordial madura y se transforma en folículo primario, más tarde en secundario y finalmente en folículo de Graff. En la ovulación se termina la Meiosis I originando el ovocito secundario que entra en Meiosis II deteniéndose en Metafase II y sólo finalizará tras la fecundación. **b) Espermatogénesis.** Las PGC proliferan y generan los gonocitos que al llegar a la pubertad se diferencian en espermatogonias que proliferan por mitosis y forman los espermatocitos primarios que entran en meiosis. De la Meiosis I se originan los espermatocitos secundarios y de la Meiosis II las espermátidas, las cuales tras su maduración forman los espermatozoides.

4.1.2. Gametogénesis *in vitro*

Existen tres tipos de células madre a partir de las cuales se han originado gametos *in vitro*: células madre embrionarias (ESC), células madre adultas (ASC) obtenidas de testículos y ovarios y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (Bonilla et al., 2016; Moreno et al., 2015).

A continuación veremos cómo se obtienen los gametos a partir de los diversos tipos de células madre.

❖ ESC

Como comentamos previamente, las células madre embrionarias son células madre pluripotentes, por ello presentan la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales, incluso pueden especializarse en células de la línea germinal bajo condiciones determinadas. A causa de estas propiedades, las ESC se convirtieron en una potencial herramienta para la medicina reproductiva (Marques-Mari et al., 2009). Los primeros ensayos exitosos con este tipo celular se dieron en ratones a principios de los 2000. Junto a su equipo de trabajo, Hubner consiguió diferenciar ESC de ratón en cultivo a unas estructuras similares a los folículos. Los ovocitos generados presentaban una morfología típica aunque la expresión génica no era completa y la ausencia de algunas proteínas como ZP1 (glicoproteína de la zona pelúcida del ovocito) impedían el correcto desarrollo, provocando muerte prematura a pesar de permitir la segmentación partenogenética (Bonilla et al., 2016). Por otro lado, Toyooka *et al.* demostraron por primera vez que las ESC de ratón podían diferenciarse *in vitro* en células equivalentes a las PGC con el potencial de sufrir meiosis y producir espermatozoides funcionales capaces de fertilizar y obtener descendencia; a pesar de ello los individuos obtenidos resultaron anómalos y fallecieron tempranamente (Bonilla et al., 2016; Merchant-Larios & Díaz-Hernández, 2013). Trabajos más recientes, como el de Li y colaboradores en 2019, muestran un cóctel de estimulación concreto para diferenciar *in vitro* células similares a SSC a partir de células similares a PGC, las cuales fueron originadas desde ESC de ratón cultivadas junto a células somáticas testiculares; estas células similares a SSC son capaces de realizar una meiosis correcta dando lugar a células como las espermátidas completamente funcionales que generaban ratones sanos (Li et al., 2019).

Las ESC humanas como células pluripotentes pueden generar linajes de células somáticas y germinales y para ello deben expresar determinados reguladores para especializarse y diferenciarse a gametos. En 2017, Jung y sus colaboradores estimularon ESC humanas para entrar en foliculogénesis y obtuvieron células parecidas a ovocitos y células de la granulosa; no obstante, no se ha logrado generar ovocitos humanos funcionales (Jung et al., 2017; Symosko et al., 2022). En 2012, Easley y colaboradores participaron en un estudio donde ESC humanas originaron células similares a SSC, incluso células similares a espermátidas; sin embargo, la diferenciación a espermatozoides *in vitro* aún no se ha conseguido (Bonilla et al., 2016; Symosko et al., 2022).

A causa de su procedencia las ESC no son la opción idónea para recuperar la fertilidad ya que no son propias del paciente; si bien, en el campo de la medicina regenerativa representan un gran potencial a pesar de las implicaciones éticas que conllevan, ya que este tipo celular se debe aislar de la masa celular interna del blastocisto, conjunto de células que da lugar al embrión y no es capaz de originar un feto viable sin las células trofoblásticas y el endodermo extraembrionario (Symosko et al., 2022; Wert & Mummery, 2003).

❖ **Células madre adultas procedentes de las gónadas**

Como comentamos anteriormente, en las gónadas de individuos adultos encontramos células madre pluripotentes. En el caso de las gónadas masculinas son denominadas células madre espermatogoniales (SSC) mientras que en las femeninas encontramos las células madre ováricas (OSC). Los pacientes de infertilidad pueden conservar un pequeño porcentaje de estas células en sus gónadas por lo que su proliferación y diferenciación *in vitro* supondría un gran avance en las técnicas de reproducción asistida ya que podrían restaurar la espermatogénesis y la foliculogénesis (Kadam et al., 2017; (Zhang et al., 2020).

Las SSC se encuentran en un número muy reducido, no alcanzan ni el 0,05% de las células presente en los testículos, por lo que la proliferación *in vitro* y autotrasplante de este tipo celular representa un gran avance para su uso como tratamiento de la infertilidad. En 2003, Kanatu-Shinohara y colaboradores, desarrollaron un medio en el que las SSC de roedores eran capaces de multiplicarse y sobrevivir a largo plazo; sin embargo, en estas condiciones de cultivo, las SSC humanas muestran un crecimiento limitado alcanzando una alta proporción de células somáticas; en 2016, Medrano y su

equipo de trabajo adaptaron el protocolo propuesto para la proliferación de SSC de ratones realizando un cocultivo de células SSC humanas de dos fenotipos diferentes las cuales presentaban diferente expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA⁻) y de antígeno de superficie de células epiteliales (EPCAM⁺) con el fin de que la fracción somática del cultivo se redujese. Como en todas las células madre adultas el nicho, en este caso el testicular, proporciona un microambiente característico de cada especie que permite la proliferación y diferenciación de las SSC. Entre los componentes principales de este microhábitat encontramos las células peritubulares, las células de Leydig y las células de Sertoli que liberan una serie de factores que marcan el destino de las células germinales (Medrano et al., 2016; Zhang et al., 2020). Por otra parte, el proceso de trasplante de las SSC cultivadas *in vitro* se realizó por primera vez en 1994 por Brinster y colaboradores. El protocolo consistía en la microinyección de SSC murinas en los túbulos seminíferos; sin embargo, la restauración de la fertilidad sólo se observa en poco más del 10% de los individuos tratados debido a las anomalías de los testículos que no generan un nicho celular óptimo (Brinster et al., 1994; Zhang et al., 2020).

En ratones se ha logrado diferenciar espermatozoides completamente funcionales a partir de estos tipos celulares; además, si las SSC son trasplantadas desde el propio paciente y el entorno somático se encuentra en condiciones óptimas se puede restablecer la espermatogénesis en primates no humanos; no obstante, desde SSC humanas cultivadas junto a células de Sertoli solo se han conseguido generar células con características propias de las espermátidas sin la posterior diferenciación a espermatozoides, lo que indica que la disposición espacial es relevante para la formación de un nicho testicular funcional *in vitro* (Figura 4) (Bonilla, 2016; Symosko, 2022; Zhang et al., 2020). Además, presentan un gran potencial terapéutico preventivo en pacientes prepuberales con cáncer que se vuelven estériles debido al tratamiento gonadotóxico. Debido a que estos pacientes todavía no presentan espermatozoides maduros, la estrategia sería la recolección de las SSC mediante biopsias testiculares antes de la quimioterapia y criopreservarse para su posterior trasplante en el paciente. Aunque el trasplante de SSC ha tenido éxito en algunos mamíferos, el uso de esta tecnología no está permitida aún en humanos ya que tiene algunas limitaciones, siendo una de las principales preocupaciones el riesgo de reintroducir células cancerosas en el paciente (Diao et al., 2022).

En el caso de las OSC, algunos autores dudan de su existencia, posiblemente porque representan una fracción aún menor que las SSC y su identificación es realmente compleja. Sin embargo, los estudios realizados por Tilly y colaboradores mostraron cómo las OSC eran capaces de diferenciarse *in vitro* a ovocitos maduros que expresaban modificaciones moleculares características de células haploides. Además, White y colaboradores probaron la existencia de OSC en ovarios de ratones y humanos que eran capaces de especificarse *in vitro* y dar lugar a células similares a ovocitos que podían ser fertilizadas y comenzar el desarrollo embrionario temprano. Por otro lado, las células somáticas y matriz extracelular participan activamente en la diferenciación de las OSC; asimismo, el nicho en el que se encuentran es más fácil de replicar *in vitro* que el nicho de las SSC ya que la estructura folicular es más sencilla y facilita el cocultivo de las OSC con sus células somáticas adyacentes (Figura 4) (Moreno et al., 2015; Silvestris et al., 2019).

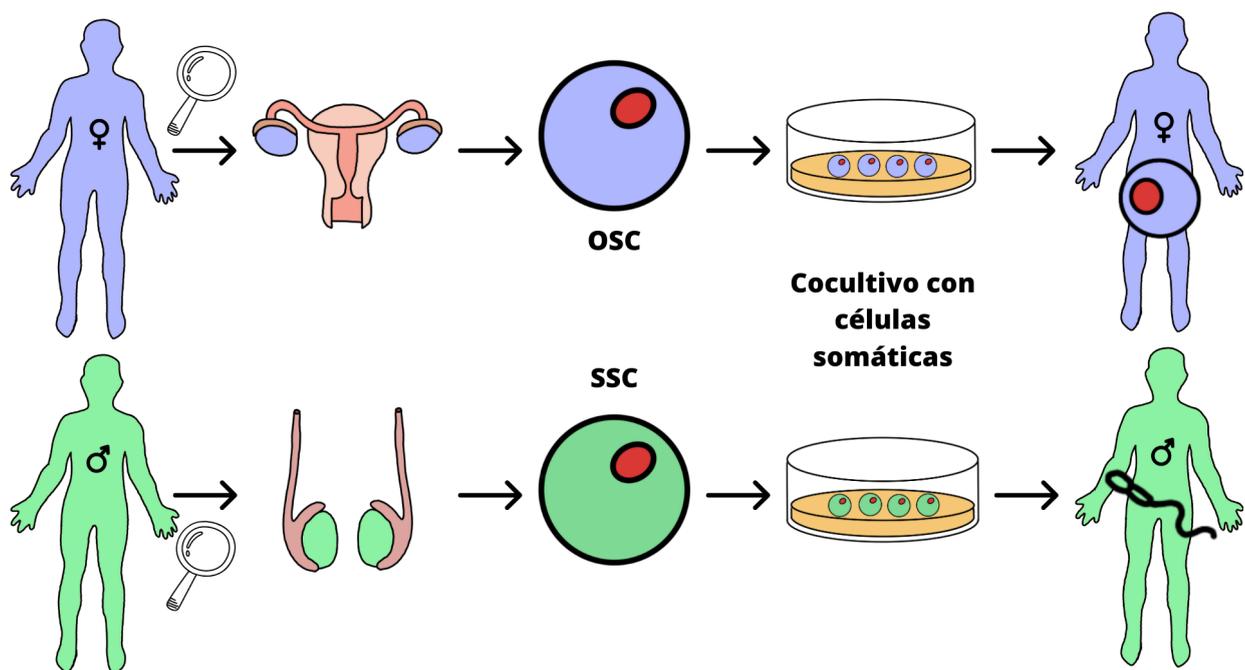


Figura 4. Modelo experimental de proliferación de células madre adultas procedentes de las gónadas.

En el interior de las gónadas encontramos células madre pluripotentes, las células madre espermatogoniales (SSC) en gónadas masculinas y las células madre ováricas (OSC) en gónadas femeninas. Estas células pueden aislarse tras una biopsia testicular u ovárica y amplificarse *in vitro* mediante su proliferación en un cocultivo con células somáticas y factores que les proporcione un nicho idóneo para, posteriormente, ser trasplantadas en pacientes con infertilidad y restaurar la espermatogénesis o foliculogénesis dependiendo del sexo.

❖ iPSC

Las iPSC presentan muchas características similares a las ESC como su potencial de diferenciación por lo que, en 2012, cuando Easley y colaboradores diferenciaron las ESC a linajes avanzados espermatogénicos también experimentaron con iPSC y demostraron que este tipo celular alcanzaba los mismos rangos de diferenciación que las ESC. Ese mismo año, Hayashi y colaboradores originaron células similares a PGC a partir de iPSC murinas que fueron trasplantadas al ovario de un ratón inmunodeficiente y, junto a las células somáticas gonadales femeninas que conformaban el nicho, fueron capaces de generar ovocitos inmaduros, los cuales fueron sometidos a una maduración y fertilización *in vitro* y originaron descendencia fértil (Symosko et al., 2022).

Además, en 2011, Panula y colaboradores originaron células germinales primordiales a partir de iPSC humanas, formadas desde fibroblastos XY y XX, al inducir la especificación mediante factores de señalización *BMP4*, *7* y *8b*, proceso que se había usado anteriormente para diferenciar ESC a células germinales primordiales. Siguiendo una metodología diseñada por Kee y colaboradores se estimuló la entrada en meiosis de las células germinales primordiales procedentes de fibroblastos XX y se comenzó la especialización de las espermátidas originadas a partir de los fibroblastos XY. Se determinó que las células iPSC tenían un potencial de diferenciación y especialización de la línea germinal muy cercano a las ESC (Figura 5) (Merchant-Larios & Díaz-Hernández, 2013).

Posteriormente, en 2018, Zhao y colaboradores perfeccionaron la técnica de especialización consiguiendo transformar iPSC humanas obtenidas de diversos pacientes con infertilidad a células similares a SSC y espermátidas, abriendo camino a pensar que los gametos generados *in vitro* pueden proceder del propio paciente; sin embargo, la viabilidad de estos gametos no pudieron ser probadas por polémicas éticas y legales (Symosko et al., 2022).

Para finalizar, debemos tener en cuenta que el protocolo seguido para generar las iPSC produce un aumento de alteraciones genéticas y epigenéticas que desencadena en una gran cantidad de mutaciones que podrían ser transmitidas a la línea germinal, por lo que este tipo celular no representan una opción segura para generar gametos aún (Gauthier-Fisher et al., 2020).

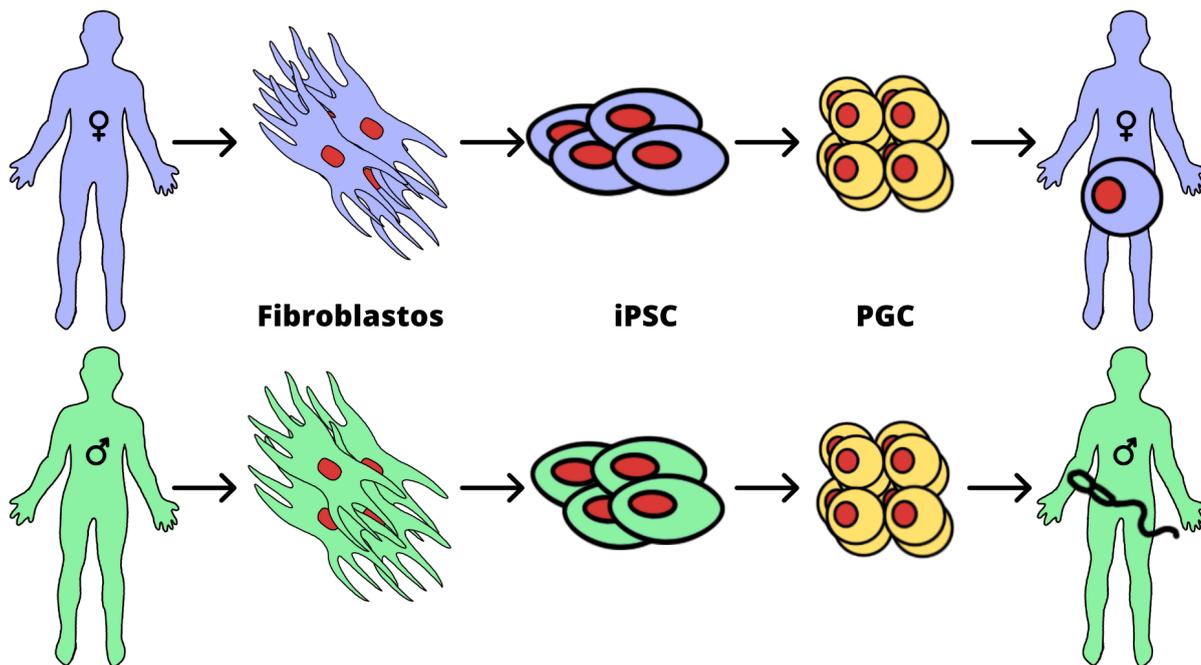


Figura 5. Modelo experimental de diferenciación de PGC a partir de iPSC.

Se aíslan fibroblastos de pacientes de diferentes sexos, se convierten en iPSC por el método de inducción de pluripotencialidad de células diferenciadas, llamado reprogramación, las iPSC se especializan en PGC al proporcionarles los factores de señalización BMP4, 7 y 8b que pueden restaurar la gametogénesis al trasplantarlas en los pacientes.

4.2. Otros usos

En el apartado anterior hemos visto los diferentes avances que se han hecho en la diferenciación de diversos tipos de células madre a gametos; en esa misma línea, las células troncales representan un gran potencial como tratamiento de algunas patologías del sistema reproductor.

En el caso de la infertilidad femenina, las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) presentan alta capacidad de adhesión por lo que algunos estudios muestran este tipo celular como un potencial tratamiento de infertilidad causada por disfunción endometrial y ovárica. Así pues, en 2016, Santamaría y colaboradores realizaron un estudio piloto donde tras suministrar MSC de médula ósea las pacientes aumentaron el grosor de su endometrio e incluso concibieron espontáneamente; por otro lado, las MSC del cordón umbilical han podido utilizarse para tratar cicatrices uterinas provocadas por cesáreas. Además, las MSC de sangre menstrual podrían estimular la proliferación de las células de la granulosa para remediar el deterioro ovárico causado por algunos fármacos anticancerígenos de amplio espectro (Saha et al., 2021).

Por otra parte, en el caso de la infertilidad masculina, se han realizado estudios en ratones con células madre derivadas del tejido adiposo cuya administración aumentaba la concentración de factores de crecimiento que activan la vía de señalización de NO/cGMP e incrementan el músculo liso del pene aliviando los síntomas de la disfunción eréctil causada por la edad (Kharazi & Badalzadeh, 2020). También se han utilizado MSC, células madre de la cresta neural, células progenitoras endoteliales y células madre derivadas del músculo en estudios con ratones y ratas y se consiguió restaurar la función eréctil y fisiología del pene, aunque no se conoce la duración de los efectos beneficiosos (Lin, 2014).

5. CONCLUSIONES

Las células madre pueden ser un tratamiento efectivo para la infertilidad. Se ha conseguido generar *in vitro* células que restablecen completamente la gametogénesis en modelos animales permitiéndoles engendrar descendencia propia completamente sana; además, en humanos se ha logrado crear células capaces de diferenciarse a estados muy avanzados de la línea germinal como folículos primordiales o espermátidas a partir de diferentes tipos de células troncales.

Las ESC, gracias a su condición de pluripotencialidad, son capaces de diferenciarse en células de la línea germinal *in vitro* como SSC que posteriormente pueden ser trasplantadas a pacientes de infertilidad y restablecer la gametogénesis; sin embargo, la generación de gametos desde ESC no proporcionaría descendencia genética propia de los pacientes, además, su uso en humanos está muy limitado ya que es necesario destruir un embrión para su obtención por lo que presenta restricciones éticas; por tanto, el uso de otros tipos de células madre procedentes de los propios pacientes son más adecuadas. Por ejemplo, las células madre adultas procedentes de las gónadas, como las SSC que pueden generar espermatogonias en un nicho determinado o las OSC que son capaces de originar células parecidas a ovocitos; no obstante, estas células se encuentran en muy bajo número y son difíciles de aislar por lo que los estudios se han centrado en crear un medio en el que puedan proliferar para conseguir una densidad de células suficiente que permita restaurar la gametogénesis al trasplantarlas en los pacientes.

Por otro lado, debemos destacar las iPSC, que en ratones permiten generar células de la línea germinal a partir de células somáticas con el genotipo del paciente sin depender del aislamiento de un tipo celular que representa una fracción muy reducida. Sin embargo, el

proceso de reprogramación y posterior diferenciación lleva a que tanto la estabilidad genética de estas células como la capacidad de generar descendencia no sea segura actualmente. En un futuro este procedimiento podría realizarse partiendo de células humanas y permitir la restauración de la fertilidad.

Aunque existen numerosos avances en el campo de las células madre en medicina reproductiva y el futuro de la derivación de gametos *in vitro* puede ser prometedor, actualmente no se ha logrado generar *in vitro* gametos seguros que sean exactamente iguales a los producidos *in vivo*. Por otro lado, las investigaciones centradas en el uso de células madre para el tratamiento de alteraciones del tracto reproductivo han conseguido resultados prometedores, sin embargo se basan en modelos animales y los estudios con pacientes aún son preliminares.

Por el momento, se requiere más investigación en este campo ya que existen numerosas barreras para el uso de células madre en clínica de forma segura.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arroyo, A., Kim, B., & Yeh, J. (2020). Luteinizing hormone action in human oocyte maturation and quality: signaling pathways, regulation, and clinical impact. *Reproductive Sciences*, 27, 1223-1252. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00137-x>
- Bassas, L. (2001). Espermatogénesis e Infertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 18, 11-17.
- Bonilla, E., Bahena, I., Ducolomb, Y., González, C., Casas, E., González-Márquez, H., & Betancourt, M. (2016). Formación de ovocitos y espermatozoides in vitro. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3), 5-10.
- Brinster, R. L., & Zimmermann, J. W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11298-11302. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11298>
- de la Fuente Hernández, L. A. (2015). Gametogénesis, fecundación, determinación del sexo, nidación y placentación. *Tratado de Reproducción Humana para Enfermería*, 43.
- Diao, L., Turek, P. J., John, C. M., Fang, F., & Reijo Pera, R. A. (2022). Roles of spermatogonial stem cells in spermatogenesis and fertility restoration. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 773. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.895528>
- Dorin, R. P., & Koh, C. J. (2011). Fetal tissues. In *Principles of Regenerative Medicine* (pp. 819-832). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381422-7.10045-8>
- Gauthier-Fisher, A., Kauffman, A., & Librach, C. L. (2020). Potential use of stem cells for fertility preservation. *Andrology*, 8(4), 862-878. <https://doi.org/10.1111/andr.12713>
- Gazarian, K. (2011). Reprogramación de células diferenciadas al estado pluripotencial. En R. Pelayo, J. Santa-Olalla & I. Velasco (Eds.), *Células troncales y medicina regenerativa* (298-316). Ediciones Buena Onda S.A.
- Goszczynski, D. E., Denicol, A. C., & Ross, P. J. (2019). Gametes from stem cells: Status and applications in animal reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 22-31. <https://doi.org/10.1111/rda.13503>
- Grieve, K. M., McLaughlin, M., Dunlop, C. E., Telfer, E. E., & Anderson, R. A. (2015). The controversial existence and functional potential of oogonial stem cells. *Maturitas*, 82(3), 278-281. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.07.017>
- Gurdon, J. B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Development*, 10(4), 622-640. <https://doi.org/10.1242/dev.10.4.622>

- Hui, H., Tang, Y., Hu, M., & Zhao, X. (2011). *Stem cells: general features and characteristics*. In *Stem cells in clinic and research*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/23755>
- Instituto Valenciano de Infertilidad (2023). ¿Qué es fecundación in vitro (FIV)? <https://ivi.es/blog/que-es-la-fecundacion-in-vitro/#:~:text=La%20Fecundaci%C3%B3n%20In%20Vitro%20o,para%20transferir%20al%20%C3%BAtero%20materno>.
- Jaime Pérez, J. C., Garza Veloz, I., & Ortiz López, R. (2007). Células madre. *Medicina Universitaria*, 9(36), 130-140.
- Jin, J. (2015). Tratamientos para la infertilidad. *Hoja para el paciente de jama. Salud de la mujer*, 313(3), 320.
- Jung, D., Xiong, J., Ye, M., Qin, X., Li, L., Cheng, S., ... & Kee, K. (2017). In vitro differentiation of human embryonic stem cells into ovarian follicle-like cells. *Nature communications*, 8(1), 15680. <https://doi.org/10.1038/ncomms15680>
- Kadam, P., Van Saen, D., & Goossens, E. (2017). Can mesenchymal stem cells improve spermatogonial stem cell transplantation efficiency? *Andrology*, 5(1), 2-9. <https://doi.org/10.1111/andr.12304>
- Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., ... & Osafune, K. (2019). Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiological reviews*, 99(1), 79-114. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2017>
- Kharazi, U., & Badalzadeh, R. (2020). A review on the stem cell therapy and an introduction to exosomes as a new tool in reproductive medicine. *Reproductive Biology*, 20(4), 447-459. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.002>
- Lee, Y., & Kang, E. (2019). Stem cells and reproduction. *BMB reports*, 52(8), 482-489. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2019.52.8.141>
- Li, N., Ma, W., Shen, Q., Zhang, M., Du, Z., Wu, C., ... & Hua, J. (2019). Reconstitution of male germline cell specification from mouse embryonic stem cells using defined factors in vitro. *Cell Death & Differentiation*, 26(10), 2115-2124. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0280-2>
- Lin C-S. (2014) Advances in Stem Cell Therapy for Erectile Dysfunction. *Advances in Andrology*, 2014, 1-20. <https://doi.org/10.1155/2014/140618>

- Marques-Mari, A. I., Lacham-Kaplan, O., Medrano, J. V., Pellicer, A., & Simón, C. (2009). Differentiation of germ cells and gametes from stem cells. *Human reproduction update*, 15(3), 379-390. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp001>
- Martin-Inaraja, M., & Eguizabal, C. (2022). Challenges of stem cell therapies for the treatment of infertility in reproductive medicine. In *Stem Cells in Reproductive Tissues and Organs: From Fertility to Cancer*, 7(pp. 1-24). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-90111-0_1
- Mata Miranda, M., Vázquez Zapién, G. J. & Sánchez-Monroy, V. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*, 27(3), 194-199.
- Medrano, J. V., Rombaut, C., Simon, C., Pellicer, A., & Goossens, E. (2016). Human spermatogonial stem cells display limited proliferation in vitro under mouse spermatogonial stem cell culture conditions. *Fertility and Sterility*, 106(6), 1539-1549. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1065>
- Merchant-Larios, H. & Díaz-Hernández, V. 2013. Gónadas, células germinales y células troncales. En R. Pelayo, J. Santa-Olalla & I. Velasco (Eds.), *Células troncales y medicina regenerativa* (71-88). Ediciones Buena Onda S.A.
- Molfino, H. M. G., & Figueroa, H. G. (2017). Las espermatogonias de mamíferos. *Biotempo*, 14(2), 233-243. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v14i2.1359>
- Moore, H., Udayashankar, R., & Aflatoonian, B. (2008). Stem cells for reproductive medicine. *Molecular and cellular endocrinology*, 288(1-2), 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.019>
- Moreno, I., Míguez-Forjan, J. M., & Simón, C. (2015). Artificial gametes from stem cells. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 42(2), 33. <https://doi.org/10.5653/cerm.2015.42.2.33>
- Moreno Jiménez, A. (2021). *Células madre e infertilidad* [Trabajo fin de máster, Universidad Europea]. Titula. <http://hdl.handle.net/20.500.12880/722>
- National Cancer Institute (2016). NCI Dictionary of Cancer Terms: reproductive medicine. <https://www.cancer.gov/search/results?swKeyword=reproductive+medicine>
- Navarro Santos, B. (2023). *Influencia de las nulisomías espermáticas en la infertilidad: caracterización proteómica e identificación de biomarcadores diagnóstico y de selección* [Tesis doctoral, Universidad del País Vasco]. Archivo digital docencia investigación. <http://hdl.handle.net/10810/59879>

- Nuñez Sanz, Y. E. (2022). Técnicas de reproducción asistida y el derecho a tener una familia. 2022. <https://hdl.handle.net/20.500.12692/103472>
- Pardo, V. M. R. (2005). Células madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas Scientiarum*, 10(1), 5-14. <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4932>
- Pera, M. F., Reubinoff, B., & Trounson, A. (2000). Human embryonic stem cells. *Journal of cell science*, 113(1), 5-10. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.1.5>
- Pérez Pita, D. C. (2015). *Presupuestos éticos y jurídicos mínimos que se deben tener en cuenta ante una inminente regulación de técnicas de reproducción asistida en el Perú* [Tesis de maestría, Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo, Chiclayo, Perú]. Repositorio de Tesis USAT. <http://hdl.handle.net/20.500.12423/560>
- Pimentel Parra, G. A., & Murcia Ordoñez, B. (2017). Células madre, una nueva alternativa médica. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(1), 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.rprh.2017.10.013>
- Poulsom, R., Alison, M. R., Forbes, S. J., & Wright, N. A. (2002). Adult stem cell plasticity. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 197(4), 441-456. <https://doi.org/10.1002/path.1176>
- Ramirez Moran, A. F., Cala Bayeux, Á., Fajardo Iglesia, D. & Scott Grave de Peralta, R. (2019). Factores causales de infertilidad. *Revista Información Científica*, 98(2), 283-293.
- Rojas Quintana, P., Medina Tío, D. & Torres Ajá, L. (2011). Infertilidad. *Medisur*, 9(4), 340-350.
- Saha, S., Roy, P., Corbitt, C., & Kakar, S. S. (2021). Application of stem cell therapy for infertility. *Cells*, 10(7), 1613. <https://doi.org/10.3390/cells10071613>
- Shah, A. A., & Khan, F. A. (2021). Types and Classification of Stem Cells. *Advances in Application of Stem Cells: From Bench to Clinics*, 25-49. https://doi.org/10.1007/978-3-030-78101-9_2
- Silvestris, E., D'oronzio, S., Cafforio, P., Kardhashi, A., Dellino, M., & Cormio, G. (2019). In vitro generation of oocytes from ovarian stem cells (OSCs): in search of major evidence. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6225. <https://doi.org/10.3390/ijms20246225>
- Solís, S. (2000). Técnicas de reproducción asistida. Aspectos bioéticos. *Cuadernos de bioética*, 41, 37-47.

- Swain, N., Thakur, M., Pathak, J., & Swain, B. (2020). SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 24(2), 368. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_22_20
- Symosko, K. M., Schatten, G., & Easley, C. A. (2022). Gamete Production from Stem Cells. *Female and Male Fertility Preservation*, 395-407. https://doi.org/10.1007/978-3-030-47767-7_32
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Valero Palencia, P.; Arraiz, N.; Chacín, M.C.; Añez, R.; Toledo, A.; Pacheco, M.; Mujica, E.; Mujica, A. & Bermúdez, V. (2011). Células madre: fundamentos y experiencias de terapia celular. *Diabetes Internacional*, 3(1).
- Velásquez Penagos, J. G. (1994). *Gametogénesis o gametogenia*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/32073>.
- Virant-Klun, I. (2015). Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem cells and cloning: advances and applications*, 49-60. <https://doi.org/10.2147/sccaa.s32650>
- Wert, G. D., & Mummery, C. (2003). Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Human reproduction*, 18(4), 672-682. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg143>
- Zhang, P. Y., Fan, Y., Tan, T., & Yu, Y. (2020). Generation of artificial gamete and embryo from stem cells in reproductive Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 781. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00781>
- Zhao, Y. X., Chen, S. R., Su, P. P., Huang, F. H., Shi, Y. C., Shi, Q. Y., & Lin, S. (2019). Using mesenchymal stem cells to treat female infertility: an update on female reproductive diseases. *Stem cells international*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9071720>
- Zheng, Y., Thomas, A., Schmidt, C. M., & Dann, C. T. (2014). Quantitative detection of human spermatogonia for optimization of spermatogonial stem cell culture. *Human Reproduction*, 29(11), 2497-2511. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu232>