



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**CÉLULAS MADRE Y SU APLICACIÓN EN LA
REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Autor: Laura Ruiz Ballester

Tutor: Prof. Dra. D^a Rafaela Raposo González

Convocatoria: Febrero 2017

1. RESUMEN

El presente trabajo trata del papel que juegan las células madre en la fecundación *in vitro* y los espectaculares avances que en este campo se están realizando en la actualidad.

A finales de 2016 a partir de una célula madre y por transdiferenciación y/o reprogramación se puede obtener un óvulo, que fecundado e implantado puede originar un individuo, abriendo un nuevo mundo de posibilidades en medicina regenerativa. Queda mucho por investigar, pero parece que el camino está abierto y es prometedor, y se perfila como un modo más de ayudar a las personas con problemas de infertilidad.

PALABRAS CLAVE: Célula madre, fecundación *in vitro*, reproducción asistida, reprogramación, óvulo.

Key words: *Stem cell, in vitro fertilization, assisted reproductive technology, reprogramming, oocyte.*

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

A continuación se pasará a exponer de forma reducida conceptos necesarios para la comprensión del presente trabajo. En primer lugar se presentarán los tipos de células madre; después se aportarán datos sobre la infertilidad, se explicará qué es la medicina regenerativa y la terapia celular; y por último, se hablará del empleo de la fecundación *in vitro* en España.

Células madre:

Las células madre (o células troncales, por su traducción del inglés, *stem cells*) son aquellas que se encuentran en todos los organismos pluricelulares y que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente (a través de la mitosis) y **diferenciarse** a distintos tipos celulares morfológica y funcionalmente¹. Además, tienen la capacidad de **autorrenovarse** para producir más células madre, es decir, pueden dividirse asimétricamente dando lugar a dos células hijas, una de las cuales tiene las mismas propiedades que la célula madre original y la otra adquiere la capacidad de poder diferenciarse si las condiciones ambientales son adecuadas.² Durante este proceso, una única célula madre puede originar de 200.000 a 400.000 células al día.

Las células madre pueden dividirse en cuatro tipos:

1. **Células madre embrionarias.**

Las **células madre embrionarias humanas** (*human embryonic stem cells*, hESCs) se obtienen de la masa interna del blastocisto de un embrión de entre 5 y 7 días y de las gónadas en desarrollo, células germinales obtenidas del embrión de entre 6 y 8 semanas.

Son pluripotentes, pueden dar origen a las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Una característica fundamental de este tipo de células es que pueden mantenerse (en el embrión o en determinadas condiciones de cultivo) de forma indefinida, formando al dividirse una célula idéntica a ellas mismas, y manteniendo una población estable de células madre (autorrenovación).³

En la actualidad se utilizan como modelo para estudiar el desarrollo embrionario y para entender los mecanismos y las señales que permiten a una célula pluripotente llegar a formar cualquier célula plenamente diferenciada del organismo.

Las fuentes de obtención de estas células que se utilizan de manera rutinaria o que han empezado a postularse son: Embriones crioconservados, blastómeros individuales, partenogénesis y obtención a base de donantes cadavéricos.⁴

El empleo de estas células presenta las siguientes ventajas: Son pluripotenciales, gran capacidad de proliferar *in vitro*, se pueden manipular para reparar daños genéticos. Por otro lado, también presentan los siguientes inconvenientes: Rechazo, bajo grado de eficacia, crecimiento incontrolado, dificultad de obtener líneas celulares puras.

2. Células madre adultas.

Las células madre adultas se encuentran en una gran cantidad de tejidos y órganos, siendo más estudiadas las localizadas en sangre periférica, piel y músculo. Actualmente una de las aplicaciones de uso rutinario que presentan es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (THP) o trasplante de células madre hematopoyéticas (*Hematopoietic stem cells*, HSC).⁵

En humanos, se conocen hasta ahora alrededor de 20 tipos distintos de células madre adultas, que son las encargadas de regenerar los tejidos en continuo desgaste como la piel, la sangre o el intestino o bien tejidos que han sufrido un daño.

Investigaciones médicas predicen que, con el uso de la tecnología derivada de investigaciones de las células madre adultas y embrionarias, se podrá tratar el cáncer, diabetes, lesiones de la espina dorsal y daños en los músculos, entre otras enfermedades. Muchos tratamientos prometedores para enfermedades graves han sido aplicados usando células madre adultas.⁶

La ventaja de las células madre adultas sobre las embrionarias es que no hay problema de rechazos, pues normalmente estas células son extraídas del **propio** paciente.

3. **Células madre pluripotentes inducidas** (*Induced Pluripotent Stem Cells*, iPS).

Son células maduras del organismo manipuladas para que pierdan su identidad y regresen a un estado similar al embrionario, permitiendo así el estudio de células madre sin la necesidad de recurrir a óvulos o embriones. Actualmente se están utilizando, entre otras cosas, para el ensayo robotizado de fármacos: En cada pocillo de una placa se ensaya un compuesto distinto, permitiendo así hacer una selección entre una amplia gama de posibles fármacos para una determinada enfermedad.⁷

Este tipo de células no puede formar un organismo completo, pero sí cualquier otro tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo). Pueden, por lo tanto, formar linajes celulares.⁸

Son generadas a partir de células adultas mediante un proceso denominado **reprogramación**, que consiste en la expresión ectópica de cuatro factores de transcripción (Oct 4, Sox 2, Klf 4 y Myc).⁹ Desde su descubrimiento por Shinya Yamanaka en el año 2006 han sido objeto de numerosos estudios debido al gran potencial que presentan.

4. **Células madre mesenquimales.**

Las células madre mesenquimales se pueden encontrar principalmente en médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical y placenta.

Tienen una gran plasticidad, son capaces de convertirse en distintos tipos celulares, incluso en neuronas en determinadas circunstancias. Al ser inhaladas, estas células llegan en una hora, a través del nervio olfatorio, a áreas corticales profundas del cerebro, donde se ha visto que pueden detener en parte la destrucción de neuronas. Este hecho puede suponer un gran avance en el tratamiento de enfermedades neurológicas, al poder instilarse por vía nasal y llegar a determinadas áreas cerebrales lesionadas.

Además, al ser inhaladas a través de la nariz, se puede administrar el tratamiento de forma sencilla y tantas veces como se desee.

Este tipo de células tienden a dirigirse a zonas del organismo donde se ha producido una inflamación. Debido a esta propiedad, recientemente se han realizado estudios incorporando a estas células madre mesenquimales nanopartículas con fármacos antitumorales. Las células se dirigen al tumor (zona donde se ha producido una inflamación) y una vez allí el fármaco es liberado mediante destrucción de las nanopartículas con ultrasonido.

Por lo tanto, las aplicaciones que presentan estas células son muy amplias y variadas: Transplante de médula ósea, enfermedades autoinmunes, enfermedades degenerativas, vehículo de virus y fármacos, trasplante de órganos, entre otras.

Infertilidad:

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad es "una enfermedad del aparato reproductor definida por la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales sin protección regular".¹⁰ Se suele recomendar comenzar las evaluaciones de las parejas a partir de este momento, inmediatamente si hay una causa obvia de infertilidad o subfertilidad, o cuando la mujer tiene más de 35 años de edad.¹¹ La infertilidad es una enfermedad que afecta a la pareja.

Se calcula que 34 millones de mujeres de países en desarrollo presentan infertilidad como consecuencia de la sepsis materna y el aborto inseguro. La infertilidad en las mujeres se clasificó como la quinta mayor discapacidad global (en población menor de 60 años).¹²

En España se estima que casi un 15% de las parejas en edad reproductiva tienen problemas de infertilidad y existen cerca de un millón de parejas demandantes de asistencia reproductiva. En los últimos años parece que los datos epidemiológicos reflejan un incremento de los problemas de fertilidad en las parejas, posiblemente derivado de múltiples factores; fisiológicos, ambientales y sociodemográficos.

Este hecho está teniendo respuesta por parte del desarrollo de las técnicas de reproducción asistida que pueden solucionar una demanda creciente.¹³

Como tratamiento se pueden utilizar diferentes técnicas, siendo una de ellas la fertilización *in vitro*. Se aplica el tratamiento en diagnósticos donde existe una obstrucción permanente en las trompas de Falopio o se han extirpado, endometriosis, así mismo en casos donde la concepción natural tiene bajas probabilidades. La posibilidad de embarazos exitosos con este tratamiento presenta tasas de éxito del 40% en el caso de mujeres menores de 35 años. Sólo en el 1% de los casos presenta riesgos que requieren hospitalización.¹⁴

España, en la actualidad, es el tercer país europeo en volumen de tratamientos, y cuenta con centros donde se desarrolla asistencia clínica e investigación clínica y básica de primer nivel. Las características de la legislación española y la calidad y número de los centros españoles han hecho de nuestro país el líder europeo en tratamientos con ovodonación.¹⁵

Medicina Regenerativa:

La **medicina regenerativa** es una rama de la medicina que se ha desarrollado considerablemente en los últimos años, aunque se remonta a los primeros trasplantes de órganos realizados durante los años cincuenta del siglo XX. Los avances en este campo se han vinculado estrechamente con los nuevos conocimientos adquiridos sobre las células madre y su capacidad de convertirse en células de diferentes tejidos.¹⁶ Esta medicina se sustenta en conductas adoptadas por el organismo para reemplazar por células sanas a las dañadas por diversos procesos en determinados tejidos. Las medidas terapéuticas empleadas pueden incluir trasplante de células madre, el uso de moléculas solubles, terapia génica e ingeniería de tejidos. En la actualidad, el método más empleado es el trasplante de células madre adultas.¹⁷

En el ser humano el término "regeneración" se ha usado clásicamente para describir el proceso mediante el cual un tejido especializado que se ha perdido es

reemplazado por la proliferación de células especializadas que no están dañadas. Este mecanismo se encuentra limitado a solo pocos tejidos, como es el caso del hígado.

Esta acción se complementa con la reposición fisiológica. En las lesiones agudas o en las lesiones y procesos degenerativos crónicos, los daños que se producen no pueden ser resueltos por los mecanismos normales con que cuenta el cuerpo humano. En tales situaciones es donde se ha planteado la utilidad de la medicina regenerativa.

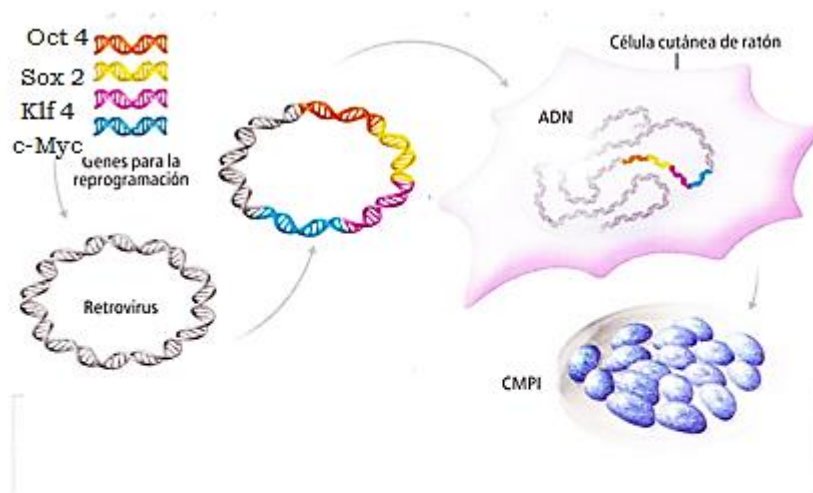
La medicina regenerativa se centra en el estudio de diversas estrategias para reemplazar funciones biológicas dañadas en el organismo. Una de ellas propone la administración de fármacos para rejuvenecer las poblaciones de células madre adultas y frenar así el envejecimiento de los tejidos.¹⁸

La **terapia celular** constituye otra opción. Se basa en la sustitución de las células perdidas por otras que se obtienen del propio paciente y se reprograman o transdiferencian en el laboratorio para su posterior trasplante. También se examina la posibilidad de producir órganos enteros en el laboratorio, a partir de biosoportos tridimensionales repoblados con distintos tipos celulares.¹⁹

En la actualidad, la mayoría de las terapias celulares se realizan con células madre de la sangre. El resto de los tratamientos con células madre se hallan en fase de ensayo clínico.²⁰

En 2006, Shinya Yamanaka, galardonado con el premio Nobel de Fisiología y Medicina, descubrió una estrategia revolucionaria: **la reprogramación** (Figura 1). Demostró que podían generarse células madre embrionarias a partir de células de la piel de un ratón.

Para llevar a cabo la reprogramación utilizaron como células diana fibroblastos de ratón, como genes exógenos los previamente identificados como expresados en las células ES, y como vehículos o vectores los retrovirus. Los cuatro genes codificando factores de transcripción resultaron esenciales para producir células iPS: los denominados Oct-3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4.²¹



2006: Yamanaka inserta 4 genes (normalmente activos en los embriones) en un retrovirus modificado e inyecta éste a su vez en células cutáneas de ratón. El virus transfiere los genes al ADN del ratón y, a continuación, los genes comienzan a reprogramar las células cutáneas para convertirlas en CMPI.

Figura 1. Esquema de obtención de células IPS a partir de células somáticas

De las células tratadas con retrovirus codificando dichos genes se seleccionaron aquellas que los expresaban con antibióticos y por la presencia del gen Fbx15. Sin embargo, estas células iPS tenían patrones de metilación del ADN distintos de los de las células ES y además no producían ratones quiméricos viables.

En 2007, el mismo grupo junto con otros grupos de investigación publicó un trabajo que demostraba que se podían obtener células iPS a partir de fibroblastos de ratón con capacidad de formar quimeras viables utilizando el gen Nanog en vez del Fbx15. Debido a que uno de los cuatro genes utilizados (c-Myc) es oncogénico, el 20% de los ratones quiméricos desarrolló cáncer. En un estudio posterior, se demostró que se pueden mantener células iPS sin c-Myc que no desarrollen cáncer, pero el procedimiento es menos eficiente.²² Este es un avance muy importante, ya que se demostró que se podían **generar células iPS humanas a partir de células humanas adultas.**

Fecundación in vitro:

La fecundación *in vitro* (FIV) es una forma de tecnología de reproducción asistida que implica la utilización de diferentes técnicas médicas que puedan permitir a una mujer quedar embarazada. La fecundación *in vitro* se intenta muy frecuentemente cuando han fallado otras técnicas de fecundación menos costosas.²³

La FIV es una técnica por la cual la fecundación de los ovocitos por los espermatozoides se realiza fuera del cuerpo de la madre. Este proceso implica el control hormonal de la ovulación, extrayendo uno o varios ovocitos de los ovarios maternos, para permitir de esta manera que sean fecundados por espermatozoides en un medio líquido. El ovocito fecundado puede entonces ser transferido al útero de la mujer, en vistas a que anide en el útero y continúe su desarrollo hasta el parto.²⁴

Para que un tratamiento de FIV tenga éxito, es necesario disponer de ovocitos sanos, espermatozoides que puedan fecundarlos y un útero que pueda mantener un embarazo.

Según la Sociedad de Tecnologías Reproductivas Asistidas (Society of Assisted Reproductive Technologies, SART), la probabilidad aproximada de dar a luz a un bebé vivo después de someterse a FIV es:²⁵

- ❖ 41% a 43% para mujeres menores de 35 años.
- ❖ 33% a 36% para mujeres de 35 a 37 años.
- ❖ 23% a 27% para mujeres de 38 a 40 años.
- ❖ 13% a 18% para mujeres de 41 años en adelante.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es exponer últimos avances científicos relacionados con las células madre en el campo de la reproducción asistida y poner de manifiesto la importancia de los mismos y lo que estos podrían suponer en un futuro.

Se tratará de contestar a preguntas como: ¿Sería posible suprimir la figura del donante de óvulos/esperma? ¿Podrían parejas del mismo sexo tener hijos que compartieran el material genético de ambos? ¿Qué otras aplicaciones pueden tener estas técnicas?

4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica extensa del tema tratado utilizando diversas fuentes bibliográficas. Se han consultado diferentes artículos de investigación clínica de publicación reciente, con el fin de obtener información lo más actual posible. También se han utilizados diferentes bases de datos, revistas científicas, libros de texto, páginas web y conferencias *online*. La lista completa de las fuentes consultadas se cita en el apartado de bibliografía.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Katsuhiko Hayashi y su equipo consiguieron de forma exitosa a finales de **2016** la obtención de óvulos a partir de células IPS y células madre embrionarias de ratón que posteriormente fueron fertilizados *in vitro* y los cuales se emplearon para generar crías de ratón sanas y fértiles en la edad adulta.²⁶ Publicaron sus resultados en la Revista *Nature* número 539, el 10 de Noviembre de 2016.²⁷

Los óvulos se originan a partir de células germinales primordiales (*primordial germ cells*, PGC). Estas se juntan con células somáticas gonadales femeninas, entran en meiosis y, por lo tanto, se convierten en ovocitos primarios. Posteriormente, los ovocitos primarios comienzan a crecer hasta ovocitos maduros, momento en el cual pueden ser fertilizados. Para reconstituir todo el proceso de ovogénesis *in vitro*, el período de cultivo se dividió en tres secciones: (1) Diferenciación *In vitro* (IVDi), (2) Crecimiento *in vitro* (IVG) y (3) Maduración *in vitro* (IVM), en las cuales la ovogénesis dará lugar a ovocitos primarios en el folículo secundario, ovocitos germinales vesicales totalmente maduros y ovocitos en metafase II (MII) (ovocito maduro o preovulatorio), respectivamente (Figura 2).

Como se ha comentado anteriormente, las PGCs se agregan a células somáticas. Los agregados, en lo sucesivo llamados ovarios reconstituidos (rOvarios), se colocan sobre el medio de cultivo Transwell-COL, a base de colágeno.

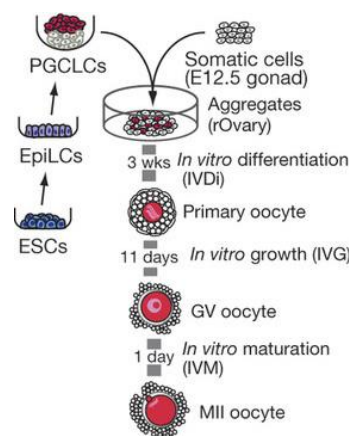


Figura 2. Esquema de la producción del ovocito *in vitro*.

(Katsuhiko Hayashi *Nature* número 539; 2016).

Para evitar la formación de múltiples folículos ováricos se agregó al cultivo el inhibidor de estrógenos ICI18278. Se llenaron los rOvarios con estructuras foliculares, cada una de ellas con un único ovocito (Figura 3).

Durante el cultivo IVDi, BV, un marcador de PGCs tempranos, fue detectable a los 3 días de cultivo, pero su detección se debilitó después de una semana de cultivo. A las dos semanas de cultivo, BV desapareció y SC, un marcador tanto de ovocitos como de PGCs, se pudo detectar en los rOvarios, y a las tres semanas de cultivo, un gran número de ovocitos primarios SC-positivos se observaron en los rOvarios.

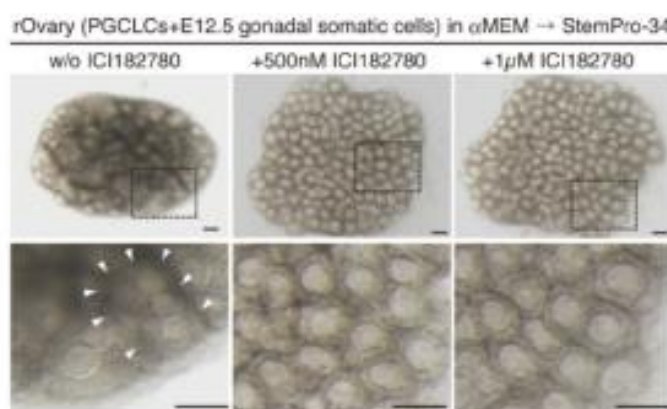


Figura 3. Cultivo de rOvarios con inhibidor de estrógenos ICI18278.
(Katsuhiko Hayashi *Nature* número 539; 2016).

Una observación minuciosa de la IVDi reveló que las agrupaciones de PGCs se formaron a los 5 días de cultivo y se fragmentaron gradualmente del día 5 al 9. Después, los folículos se formaron alrededor del día 11 de cultivo. Foxl2, un marcador funcional de las células de la granulosa, fue detectable en las células que rodean los ovocitos a los 21 días de cultivo.

El análisis por inmunofluorescencia del cromosoma meiótico reveló la robusta progresión de la profase meiótica I desde el día 5 al 9. Se vio que este proceso era similar a cómo sucede en la profase meiótica I *in vivo*. Sin embargo, se dio asinapsis entre cromosomas homólogos con más frecuencia *in vitro* (53,8%) que *in vivo* (5,3%).

Aunque el apareamiento cromosómico *in vitro* no fue tan preciso como el *in vivo*, el cultivo IVDi produjo un gran número de estructuras secundarias de tipo folículo (2FLs) a las tres semanas de cultivo; En promedio ($n = 8$), $237,3 \pm 27,3$ 2FLs se formaron por rOvario. Ovocitos SC-negativos residuales se dispersaron escasamente en los rOvarios; el porcentaje de ovocitos SC-negativos fue de $4,4 \pm 2,1\%$ ($n = 4$, 3163 ovocitos en total). Estos resultados demostraron que fueron inducidos un gran número de ovocitos primarios en las condiciones de cultivo empleadas.

El crecimiento de ovocitos junto con el crecimiento folicular está fuertemente controlado por las gonadotropinas. La hormona foliculoestimulante juega un papel central en la proliferación y maduración de las células de la granulosa. En el cultivo con medio IVG que contiene hormona estimulante de folículo, sin embargo, la proliferación de la capa de células de granulosa se produjo solo en los 2FLs localizados en el borde del rOvario, lo que sugiere que los 2FLs en la zona central carecen de señalización y/o espacio para el crecimiento celular (Figura 4). Por lo tanto, se separaron los 2FLs de los rOvarios de forma manual (Figura 5). Después de ser cultivados durante 11 días, los ovocitos primarios en 2FLs crecieron a ovocitos vesicales germinales (figura 6).

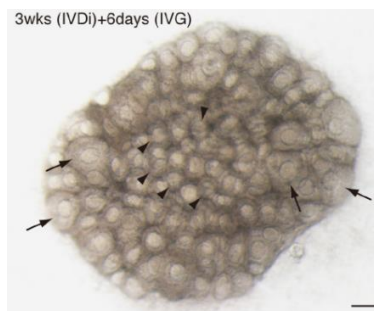


Figura 4. Maduración atenuada en un rOvario.



Figura 5. 2FLs individuales.

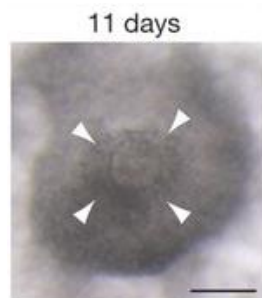


Figura 6. Crecimiento folicular

(Katsuhiko Hayashi *Nature* número 539; 2016).

En total, se obtuvieron 3,198 ovocitos vesicales germinales completamente maduros a partir de 58 rOvarios en tres experimentos. De media, se obtuvieron 55,1 ovocitos completamente desarrollados a partir de un rOvario. Los diámetros de los ovocitos MII SC-positivos generados *in vitro* fueron comparables a los de ovocitos MII *in vivo* (Figura 7).

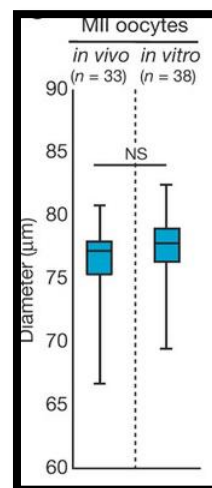


Figura 7. Diámetros de ovocitos *in vivo/in vitro*. (Katsuhiko Hayashi *Nature* número 539; 2016).



Figura 8. Embriones de dos células. (Katsuhiko Hayashi *Nature* número 539; 2016).

Posteriormente, estos ovocitos fueron fertilizados *in vitro* (IVF) con espermatozoides de ratón tipo salvaje albino de la cepa ICR. Estos ovocitos evolucionaron a embriones de dos células (Figura 8).

Once (3,5%) de los 316 embriones de dos células transferidos a hembras ICR pseudoembarazadas nacieron con éxito (línea embrionaria BVSCH18) (Figura 9).

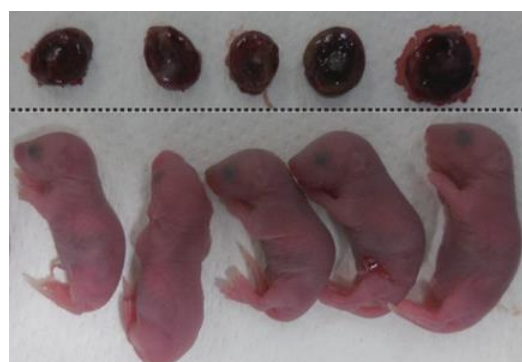


Figura 9. Seis crías representativas y sus placentas (Katsuhiko Hayashi *Nature* número 539; 2016).

Las placentas de las crías pesaban más que las de ratones de tipo salvaje, pero este fenómeno fue menos pronunciado que la placentomegalia observada en ratones clonados. Además, las crías tendían a pesar ligeramente más que los ratones de tipo salvaje, lo que puede deberse al pequeño número (o uno o dos) de crías en el cuello uterino. Utilizando embriones de dos células de ovocitos generados *in vitro*, la tasa de éxito de desarrollo a largo plazo fue del 3,5%, que es mucho menor que la de los ovocitos generados *in vivo* (61,7%). Las tasas de fertilización no fueron significativamente diferentes, pero la embriogénesis fue frecuentemente retrasada en varias etapas, como la gestación temprana y tardía.

Sin embargo, la producción exitosa de crías demuestra que el sistema de cultivo cumple la condición de producir óvulos funcionales. Es importante destacar que todas las crías obtenidas crecieron normalmente sin evidencia de muerte prematura. El análisis de restricción de bisulfito combinado (COBRA) reveló que el estado epigenético de la impronta genética se mantuvo de una manera comparable a la de ratones de tipo salvaje. Tanto las hembras como los machos de ovocitos generados *in vitro* eran fértiles y permanecieron vivos durante al menos 11 meses sin ninguna anomalía aparente.

Para verificar la robustez y reproducibilidad del sistema de cultivo, se indujo la ovogénesis en cinco líneas celulares *in vitro*: BVSCH14, que es otra línea mebrionaria de la misma cepa de ratón que BVSCH18, dos líneas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y dos líneas iPSC de fibroblastos de la cola de adultos de 10 semanas de edad (TTFs). BVSCH14 y las dos líneas iPSC derivadas de MEF (MEF4FRC9 y MEF4FC14) dieron lugar a una serie de ovocitos viables.

6. CONCLUSIONES

1. La posibilidad de obtener óvulos *in vitro* a partir de células madre supone una revolución en el campo de la reproducción asistida.
2. Permite que mujeres estériles tengan hijos con su mismo material genético, pues las células madre pueden obtenerse de células de, por ejemplo, la piel de esa misma mujer.
3. Se hace innecesaria la figura de una donante de óvulos.
4. De desarrollarse esta técnica, parejas homoparentales podrían tener hijos con el material genético de ambas partes.
5. Si este avance se perfeccionase supondría un enorme progreso en el campo científico de la medicina regenerativa, que podría llevarse también a cualquier otro campo y no sólo al reproductivo.
6. Avances científicos de este tipo generan controversia por sus implicaciones de tipo ético-religioso que deberán ser reguladas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Texas Heart Institute. Stem Cell Center research. Disponible en:
http://www.texasheart.org/Research/StemCellCenter_Esp/Informacion_basica.cfm
2. Inaba M, Yamashita YM. Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness; 5 de Octubre de 2012.
3. Aran B, Sole M, Rodriguez-Pizà I, Parriego M, Muñón Y, Boada M et al. Vitrified blastocysts from Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) as a source for human Embryonic Stem Cell (hESC) derivation; 2012.
4. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues; 12 de Noviembre de 2010.
5. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming; 2009.
6. Sablowski R. Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? Noviembre 2004.
7. Miguel Antón Ámez-Segovia. Células inducidas (IPS) y mesenquimales: nuevas terapéuticas; Abril 2012.
8. Science Spin: iPS Cell Research in the News. Clinical Pharmacology & Therapeutics, pág.: 644-646; Mayo 2011.
9. Retos de la medicina regenerativa. Revista: Investigación y Ciencia; Noviembre 2012, pág.: 56-63.
- 10, 12, 14. Infertility definitions and terminology. Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en:
<http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>
11. Kamel, RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol; 6 de Marzo de 2010.

- 13,15. Roberto Matorras Weinig. La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas. Libro Blanco Sociosanitario. Sociedad Española de Fertilidad.
16. Hernández P. Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular. Medicina regenerativa II. Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter; 2006; Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S08642892006000100002&lng=es&nrm=iso
17. . Mason C, Dunnill P. Regen. A brief definition of regenerative medicine; 2008.
- 18, 19, 20. Retos de la medicina regenerativa, Revista Investigación y Ciencia, número 34; Noviembre 2012. Disponible en:
<http://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/numero/434/retos-de-la-medicina-regenerativa-10573>
21. Takahashi K, Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors; 2006.
22. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells; 2007. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029452>
23. Irina Burd, University School of Medicine, Baltimore, MD. Artículo de MedlinePlus. Disponible en:
<https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007279.htm>
24. Urbina MT, Lerner J. Optimización de la eficiencia de la Fecundación in vitro. Fertilidad y Reproducción Asistida. Caracas: Editorial Médica Panamericana; 2008. Disponible en :
https://www.researchgate.net/publication/281525794_Optimizacin_de_a_Eficiencia_de_la_Fecundacin_in_vitro

25. Lentz GM, Lobo RA, Gershenson DM, Katz VL. Infertility: etiology, diagnostic evaluation, management, prognosis. Comprehensive Gynecology. 6ª ed. Philadelphia, Elsevier Mosby; 2012.
26. Obtienen óvulos *in vitro* a partir de células pluripotentes. Diario médico. Disponible en: <http://www.diariomedico.com/2016/10/17/cientifica/especialidades/ginecologia-y-obstetricia/obtienen-ovulos-in-vitro-a-partir-de-celulas-pluripotentes>
27. Orii Hikabe, Nobuhiko Hamazaki, Go Nagamatsu, Yayoi Obata, Yuji Hirao, Norio Hamada, So Shimamoto, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima, Mitinori Saitou & Katsuhiko Hayashi. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. Revista *Nature* número 539; 10 Noviembre 2016.