

Formación de ovocitos y espermatozoides in vitro

Edmundo Bonilla, Iván Bahena, Yvonne Ducolomb, Cristina González, Eduardo Casas, Humberto González-Márquez y Miguel Betancourt

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa
Ciudad de México, México

[mundo, duco, mcgt, dino, hgm, bet]@xanum.uam.mx, ivan.bahena@hotmail.com

Abstract— Currently, the only choice for women with premature ovarian failure and man with non-obstructive azoospermia wishing to have a child with their spouse is gamete donation. In vitro production of oocytes and sperm would bring to infertile couples the possibility of conceiving biologically related children. Gamete production has been based on the use of three types of stem cells: Embryonic; From adult ovaries and testes; and Pluripotent induced from somatic cells. This paper describes the success obtained with these methods which with no doubt will be useful to solve human and animal infertility problems and to study the molecular processes involved in gamete differentiation.

Keyword— *Oocyte, sperm, Stem Cells, Differentiation.*

Resumen— Actualmente, la única opción para que mujeres con falla ovárica prematura y hombres con azoospermia no-obstructiva puedan concebir un hijo con su pareja, es la donación de gametos. La producción de ovocitos y espermatozoides in vitro brindaría a parejas infértiles la posibilidad de procrear hijos relacionados biológicamente. Esta se ha basado en el uso de células madre de tres tipos: Embrionarias; Obtenidas de testículos y ovarios adultos; y Pluripotentes inducidas a partir de células somáticas. En este artículo se revisa el éxito obtenido con cada uno de éstas tecnologías, que sin duda serán útiles para resolver problemas de infertilidad humana y de reproducción animal asistida, así como para estudiar los procesos moleculares que ocurren durante la diferenciación de gametos.

Palabras clave: *Ovocito, Espermatozoide, Células Madre, Diferenciación*

I. INTRODUCCIÓN

La infertilidad sigue siendo un problema importante en todo el mundo. En promedio, el 9% de las parejas en edad reproductiva (globalmente, unos 70 millones de parejas) son incapaces de concebir un hijo después de un año de intentarlo, aunque en algunas regiones, como en el Sur y Centro de Asia, el Este y Norte de África y el Este de Europa, la incidencia de infertilidad puede alcanzar el 30% en algunas poblaciones [1].

Cerca de un tercio de los casos de infertilidad se debe a la incapacidad de alguno de los miembros de la pareja de producir gametos funcionales, incluyendo mujeres con falla ovárica prematura o postmenopáusicas, hombres con azoospermia no-obstructiva [2], y pacientes que recibieron tratamiento contra cáncer. Para estos pacientes, la única opción para concebir un hijo que por lo menos tenga la información genética de uno de los padres, es la donación de gametos. La producción de gametos artificiales o in vitro brindaría a estos pacientes la posibilidad de formar gametos a partir de sus propias células madre o incluso somáticas, de modo que estarían en la posibilidad de concebir un hijo que porte su información genética (“sangre de su sangre”). Otro grupo que resultaría beneficiado con la técnica de producción de gametos in vitro (PGIV) es el de las parejas del mismo sexo.

Pero ¿cómo se producen los gametos in vitro? Su producción se ha basado en el uso de células madre (stem cells) de tres tipos:

- 1) Células madre embrionarias pluripotentes obtenidas a partir de células de la masa celular interna de blastocistos.
- 2) Células madre de testículos y ovarios adultos.

- 3) Células madre pluripotentes inducidas (induced pluripotent stem cells, iPSC), que se obtienen a partir de células somáticas mediante la sobreexpresión de genes específicos.

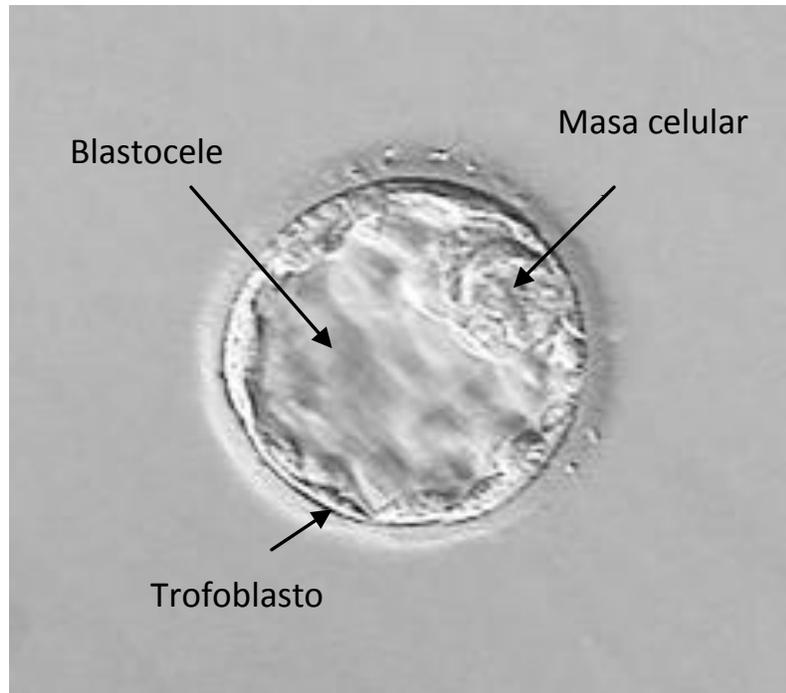


Fig. 1. Imagen de un blastocisto en el que se aprecia la masa celular interna, origen de las células madre embrionarias.

II. DIFERENCIACIÓN DE GAMETOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Los primeros trabajos en los que se logró la diferenciación *in vitro* de células germinales masculinas y femeninas se llevaron a cabo en el ratón. Hubner y cols. [3] diferenciaron células madre embrionarias en ovogonias que iniciaban la meiosis y eran capaces de reclutar a las células adyacentes y formar estructuras parecidas a folículos. Los ovocitos formados tenían un tamaño entre 50 y 70 μm , que es el tamaño normal de los ovocitos de ratón, y expresaban las glicoproteínas de la zona pelúcida ZP2 y ZP3, pero no ZP1. Los folículos tenían capacidad esteroidogénica. La funcionalidad completa de los ovocitos producidos *in vitro* se demostró años después cuando pudieron ser fertilizados y generar descendencia normal [4]. Por otro lado, Toyooka y cols. [5] pudieron diferenciar células germinales masculinas a partir de células madre embrionarias mediante la formación de “cuerpos embrionarios”, que se originan por la agregación de las células madre, que luego se diferencian hacia numerosos tipos celulares. Las células germinales fueron identificadas por la expresión del gen *Vasa*, específico de ellas. Cuando las células germinales se coincubaron con células gonadales somáticas embrionarias y se transplantaron a la cápsula de testículos de un animal receptor, se formaron túbulos seminíferos y las células germinales formaron espermatozoides maduros. Al igual que con los ovocitos formados *in vitro*, los espermatozoides artificiales obtenidos de células madre embrionarias han mostrado ser totalmente funcionales, pueden fertilizar ovocitos y generar descendencia normal [6].

En humanos, el primer estudio en el que se describe la diferenciación de células madre embrionarias a células germinales fue publicado en 2004 por Clark y colaboradores [7]. La diferenciación se llevó a cabo espontáneamente en cuerpos embrionarios y la identificación de las células germinales se realizó con base en el perfil de expresión de genes específicos de células germinales maduras, incluyendo a los

genes *VASA*, *BOL*, *SCP1*, *SCP3*, *GDF9* y *TEKT1*. Varios estudios más demostraron la formación de células germinales a partir de células madre embrionarias, aunque en éstos sólo se logró una diferenciación hasta estadios tempranos (células germinales primordiales con contenido diploide de DNA). Sin embargo, Kee y cols. [8] lograron obtener células germinales haploides mediante la modulación de las proteínas con afinidad por RNA específicas de células germinales *DAZL*, *DAZ* y *BOULE*, encontrando que la proteína *DAZL* (deleted in azoospermia-like) participa en la formación de células germinales primordiales, en tanto que *DAZ* y *BOULE* promueven la diferenciación de las células germinales hasta gametos haploides. Por otra parte, Easley y cols. [9] lograron diferenciar células madre embrionarias hasta células con características de espermatidas: células haploides que expresan *ACROSINA*, *PROTEÍNA DE TRANSICIÓN 1* y *PROTAMINA 1*, que sólo se encuentran en espermatidas y espermatozoides, y que presentan improntas genómicas similares a las que presentan los espermatozoides humanos. Sin embargo, a la fecha, no se ha logrado la formación de espermatozoides humanos maduros in vitro a partir de células madre embrionarias.

En la parte femenina, la diferenciación de células madre embrionarias a ovocitos funcionales está aún más lejana. Aunque se han logrado obtener estructuras parecidas a folículos que contienen células que expresan marcadores específicos de ovocitos, como *ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, éstos no han completado la meiosis, mostrando un estado diploide [10].

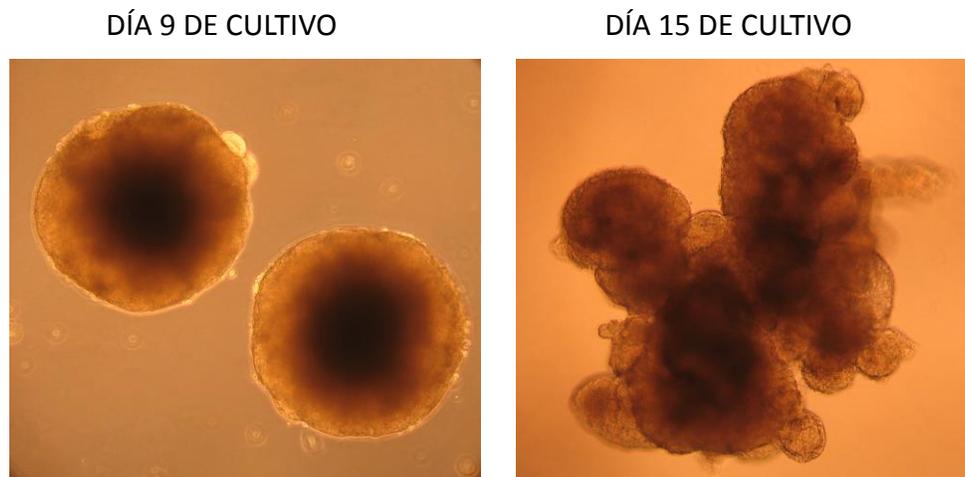


Fig. 2. Cuerpos embrionarios originados a partir de células madre embrionarias de ratón.

III. DIFERENCIACIÓN DE GAMETOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE DE ADULTOS

Dadas las implicaciones éticas que trae consigo el uso de células madre embrionarias cuando provienen de un embrión con el potencial de originar un nuevo ser humano, se han buscado alternativas que eviten su uso, éste es el caso de las células madre que se encuentran en los organismos adultos. Para la formación de gametos masculinos se han empleado células madre espermatogoniales (CME) localizadas en la lámina basal de los túbulos seminíferos y son las responsables de la formación continua de espermatozoides durante la adolescencia y adultez en los machos. Durante estas etapas, las CME se dividen asimétricamente, originando espermatogonias y más CME (proceso de autorenovación) [11].

En el ratón se logró la formación de espermatozoides maduros a partir de CME que pudieron fertilizar y generar descendencia [12]. De manera similar, ovocitos generados a partir de células madre de ovarios de neonatos fueron funcionales, siendo capaces de producir descendencia [13], abriendo la posibilidad a la existencia de células madre en ovarios de adultos, esta idea es controversial ya que la

mayoría de la evidencia indica que se diferencian a ovogonias en estadios fetales, sin autorenovarse, por lo que se piensa que las hembras al nacimiento cuentan con un número finito de ovocitos [14].

En humanos, a partir de CME cultivadas con células de Sertoli se han logrado diferenciar células haploides que presentan características de espermatidas [15], sin embargo aún no se ha logrado su diferenciación a espermatozoides. Por el lado femenino, estudios controversiales han identificado células madre en ovarios adultos que han generado ovocitos haploides, con patrones de expresión génica propios de éstos, con un tamaño entre 35 y 50 µm [16].

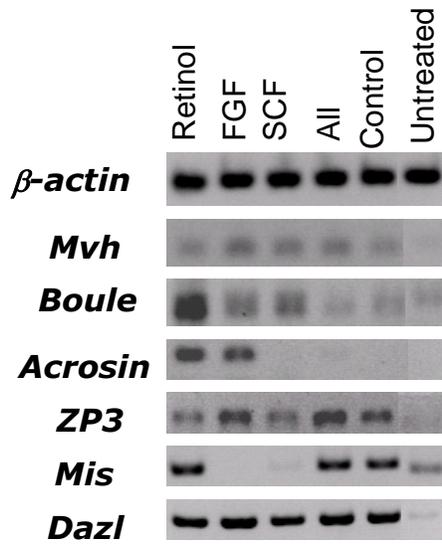


Fig. 3. Análisis de la expresión de genes específicos de la línea germinal, como son *Mvh*, *Boule*, *Acrosina*, *ZP3* y *Dazl*.

IV. DIFERENCIACIÓN DE GAMETOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE INDUCIDAS

Las células madre pluripotenciales inducidas (CMPi) son células somáticas de organismos adultos que han sido reprogramadas hasta un estado semejante al de las células madre embrionarias induciendo la expresión de genes característicos de éstas. Actualmente se usan para el desarrollo de fármacos y el estudio de enfermedades y se espera que, en un futuro, puedan ser utilizadas en el trasplante de células y tejidos con fines terapéuticos, al contar con la gran ventaja de que, por provenir del propio individuo, muy probablemente no sean reconocidas como ajenas, evitando el rechazo por el sistema inmune [17].

En el terreno de la reproducción, se ha logrado la formación de espermatozoides a partir de CMPi en ratones [18]. Por otro lado, Hayashi y cols. [4] realizaron estudios en el ratón en los que diferenciaron CMPi en ovocitos que pudieron ser fertilizados y producir descendencia.

En humanos, Eguizabal y cols. [19] sobreexpresaron factores de transcripción característicos de la línea germinal en CMPi y obtuvieron células que pudieron llevar a cabo meiosis y formar células haploides con características de espermatidas. Sin embargo, la formación de ovocitos a partir de CMPi no se ha logrado.

Además de la relevancia que tiene la formación de gametos in vitro para los grupos que desean procrear descendencia genéticamente relacionada, el desarrollo de estas tecnologías permite estudiar cómo se forman los gametos. En nuestro laboratorio hemos estudiado la participación de genes conservados evolutivamente y específicos de las gónadas en la gametogénesis, utilizando la diferenciación de células madre embrionarias de ratón a células germinales. Los resultados mostraron

que cuando se bloqueó la expresión del gen Mael mediante RNA interferente, se impidió la diferenciación a células germinales, como lo evidenció la falta de expresión de los genes específicos de células germinales analizados [20].

El esclarecimiento de los mecanismos moleculares de la gametogénesis, hará posible el desarrollo de mejores métodos para producir gametos in vitro completamente funcionales en humanos.

V. CONCLUSIÓN

La producción in vitro de gametos, tanto femeninos como masculinos, es un campo en desarrollo. Los mejores resultados han sido obtenidos mediante el uso de células madre embrionarias, con la que se han formado ovocitos y espermatozoides artificiales de ratón totalmente funcionales, capaces de llevar a cabo la fertilización y generar descendencia normal, en tanto que en humanos se ha conseguido células haploides con características de espermátidas y células parecidas a ovocitos en estructuras similares a la de los folículos. Sin embargo, dadas las implicaciones éticas que plantea el uso de células madre embrionarias, el uso de células madre de gónadas de individuos adultos, así como de células madre pluripotentes inducidas a partir de células somáticas ha tenido un auge importante. Los resultados obtenidos a partir de células madre de testículos y ovarios de organismos adultos son similares a los obtenidos a partir de células madre embrionarias, aunque la generación de ovocitos usando esta metodología ha sido ampliamente discutida, ya que no ha logrado ser reproducida en otros laboratorios. Finalmente, la tecnología más revolucionaria y prometedora es la formación de gametos a través de células madre pluripotentes inducidas a partir de células somáticas, con la que en el ratón se han generado ovocitos que pudieron producir descendencia, así como espermatozoides, y en humanos se han producido células haploides con características de espermátidas. Queda mucho camino por andar, pero está claro que en el mediano plazo, la producción artificial de gametos permitirá resolver problemas de infertilidad y de reproducción animal asistida y facilitará el esclarecimiento de los procesos moleculares de la diferenciación de gametos.

REFERENCIAS

- [1] Izzo, C.R., P.A. Monteleone, and P.C. Serafini, *Human reproduction: current status*. Rev Assoc Med Bras, 2015. 61(6): p. 557-9.
- [2] Kashir, J., et al., *Viability assessment for artificial gametes: the need for biomarkers of functional competency*. Biol Reprod, 2012. 87(5): p. 114.
- [3] Hubner, K., et al., *Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells*. Science, 2003. 300(5623): p. 1251-6.
- [4] Hayashi, K., et al., *Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice*. Science, 2012. 338(6109): p. 971-5.
- [5] Toyooka, Y., et al., *Embryonic stem cells can form germ cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(20): p. 11457-62.
- [6] Nayernia, K., et al., *In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice*. Dev Cell, 2006. 11(1): p. 125-32.
- [7] Clark, A.T., et al., *Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro*. Hum Mol Genet, 2004. 13(7): p. 727-39.
- [8] Kee, K., et al., *Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation*. Nature, 2009. 462(7270): p. 222-5.
- [9] Easley, C.A.t., et al., *Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells*. Cell Rep, 2012. 2(3): p. 440-6.
- [10] Novak, I., et al., *Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis*. Stem Cells, 2006. 24(8): p. 1931-6.

- [11] Moreno, I., J.M. Miguez-Forjan, and C. Simon, *Artificial gametes from stem cells*. Clin Exp Reprod Med, 2015. 42(2): p. 33-44.
- [12] Sato, T., et al., *In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines*. Nat Commun, 2011. 2: p. 472.
- [13] Zou, K., et al., *Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries*. Nat Cell Biol, 2009. 11(5): p. 631-6.
- [14] Forabosco, A. and C. Sforza, *Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary*. Fertil Steril, 2007. 88(3): p. 675-83.
- [15] Riboldi, M., et al., *In vitro production of haploid cells after coculture of CD49f+ with Sertoli cells from testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermic patients*. Fertil Steril, 2012. 98(3): p. 580-590.e4.
- [16] White, Y.A., et al., *Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women*. Nat Med, 2012. 18(3): p. 413-21.
- [17] Pappas, J.J. and P.C. Yang, *Human ESC vs. iPSC-pros and cons*. J Cardiovasc Transl Res, 2008. 1(2): p. 96-9.
- [18] Yang, S., et al. *Derivation of male germ cells from induced pluripotent stem cells in vitro and in reconstituted seminiferous tubules*. Cell Prolif, 2012. 45: p. 91-100.
- [19] Eguizabal, C., et al. *Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells*. Stem Cells, 2011. 29:1186-95.
- [20] Bahena, I., et al., *Role of Mael in early oogenesis and during germ-cell differentiation from embryonic stem cells in mice in vitro*. Zygote, 2014. 22(4): p. 513-20.