

Reunión científica anual de SAMeR

15/05/2014

Silvia Ciarmatori¹, Laura Mitelberg²

¹Servicio de Ginecología del Hospital Italiano de Buenos Aires - Sección Reproducción.

²Grupo Reproducción Humana, Hospital Durand.

Reproducción 2014;29:104-110

El jueves 15 de mayo de 2014 se realizó la segunda reunión científica de SAMeR, en la Fundación Cassará, Avenida de Mayo 1190. El tema abordado fue: "Preservación de la fertilidad".

Indicaciones, estrategias y aspectos clínicos en la preservación de la fertilidad

Guillermo Terrado

Pregna

Los recientes avances en la terapia oncológica han hecho que el número de sobrevivientes a distintos tipos de cáncer haya aumentado significativamente en los últimos años. De acuerdo a lo reportado por la literatura, en los últimos 25 años la tasa de supervivencia a 5 años ha aumentado en forma global en la mujer de 54 a 62%.

Muchas de estas pacientes se encuentran en edad reproductiva y aun no tienen hijos o no han completado sus deseos de maternidad. Se estima que en forma global en el grupo etario de mujeres de 15 a 39 años la incidencia de cáncer es de 45,4 por 100.000 y en el grupo de 40 a 45 años es de 183,7 por 100.000.

Tomando como ejemplo al cáncer de mama (el más frecuente en la mujer) la tasa de supervivencia a 5 años aumentó de 75,2% en la década del 70 a 86,9% en la actualidad. Lo mismo ocurre con los cánceres de origen hematológico (leucemias y linfomas).

El problema es que la supervivencia se asocia a menudo a un compromiso de la reserva ovárica. Por otra parte, la tendencia mundial a demorar la maternidad hace que muchas pacientes no tengan hijos o no hayan completado su familia al momento de realizar los tratamientos.

La edad de la paciente al momento del diagnóstico y tratamiento oncológico es de suma im-

portancia, ya que la posibilidad de desarrollar una falla ovárica, una menopausia precoz y como consecuencia una esterilidad permanente será mayor en aquellas pacientes mayores de 25 años. En las pacientes menores de 20 la posibilidad de este tipo de consecuencias es mucho menor.

Además de la edad, dentro de los factores que influyen en la posibilidad de desarrollar una falla ovárica precoz posterior al tratamiento quimioterapéutico se encuentra la dosis acumulativa y el tipo de agentes citotóxicos utilizados. De tal forma dichos agentes pueden dividirse entre aquellos de alto riesgo (por ejemplo, Ciclofosfamida, Busulfán, Clorambucilo o Procarbina), los de riesgo moderado (como el Cisplatino o la Adriamicina) y los de bajo riesgo (dentro de los que se incluyen al Metotrexato, 5-Fluorouracilo, Vincristina, Bleomicina o la Actinomicina-D).

La preocupación de las pacientes por su fertilidad posterior al tratamiento es un aspecto que afortunadamente cada vez está siendo tenido más en cuenta. La Asociación Americana de Oncología Clínica incluye la necesidad de un correcto y pronto asesoramiento acerca de este tema, siempre antes de iniciar el plan terapéutico para su patología de base. Motivados por esta preocupación es que surgieron en los últimos años distintas asociaciones que nuclean a pacientes y profesionales con el objeto de abordar de la mejor manera posible esta problemática. Una de las más renombradas a nivel mundial en la actualidad es el *Oncofertility Consortium* (<http://oncofertility.northwestern.edu>), quien fomenta campañas de información para pacientes y profesionales a través de la web, aplicaciones en celulares, congresos, publicaciones, y su relación con instituciones a nivel global. En la Argentina, este consorcio generó este año una asociación con Pregna Medicina Reproductiva para

el desarrollo de trabajos de investigación y campañas informativas en nuestro país.

Dentro de las estrategias descriptas para preservar la fertilidad en pacientes que van a ser sometidas a tratamiento oncológico podemos mencionar:

1. Criopreservación embrionaria.
2. Criopreservación (vitrificación) de ovocitos.
3. Criopreservación de tejido ovárico.
4. Trasposición ovárica.
5. Protección hormonal con el uso de análogos de GnRH.
6. Protección con agentes antiapoptóticos.

Describiremos a continuación algunas ventajas y desventajas de cada una de ellas:

1. Para la criopreservación embrionaria se requiere la realización de todos los pasos que forman parte de una FIV (hiperestimulación ovárica controlada, punción folicular y fertilización in vitro). Este proceso dura habitualmente entre 2 a 3 semanas y requiere la administración de gonadotrofinas, lo que eleva los niveles de estradiol sérico a niveles suprafisiológicos. Esta situación puede ser riesgosa para el pronóstico de ciertos tipos de cáncer.

También debemos tener en cuenta los aspectos médico-legales en el caso de que la paciente lamentablemente muera.

2. La vitrificación de ovocitos se ha establecido en los últimos años como una excelente alternativa a la criopreservación embrionaria, hecho motivado por las altas tasas de éxito con buena recuperación al descongelamiento utilizando esta técnica. No presenta los reparos éticos de la preservación embrionaria y puede ofrecerse a pacientes sin pareja.

En ambas situaciones los problemas mayores a los que nos enfrentamos, entre otros, lo constituyen el cómo y cuándo realizar la hiperestimulación ovárica controlada. Son numerosas las ocasiones en las que la paciente llega a la consulta en el período periovulatorio o en fase lútea. Siguiendo un protocolo convencional, uno debería esperar el período siguiente para comenzar con la administración de gonadotrofinas, pero lamentablemente el inicio del tratamiento oncológico no puede demorarse tanto en muchos de estos casos. Así es como surgieron en la literatura diferentes esquemas de estimulación, comenzando en distin-

tos momentos del ciclo, con resultados muy similares a los esperados si utilizáramos un esquema convencional, y permitiendo a la paciente iniciar el tratamiento de su patología de acuerdo a lo propuesto inicialmente por el oncólogo.

3. La criopreservación de tejido ovárico es una técnica muy prometedora, con pocos resultados exitosos a nivel mundial a la fecha, pero que aun se considera a nivel experimental.

4. La trasposición ovárica es un procedimiento quirúrgico que se realiza para evitar la irradiación folicular en los casos de radioterapia pelviana.

5. Con respecto a la utilización de análogos de GnRH en simultáneo con la administración del tratamiento oncológico, los reportes en la literatura no son concluyentes. Si bien algunas líneas de investigación proponen un efecto protector de análogos al disminuir la vascularización ovárica e inhibir el crecimiento folicular, esto no ha sido confirmado aún por otros autores. Sin embargo, su utilización se recomienda como alternativa en aquellas situaciones en las que no se disponga de otra estrategia.

6. La utilización de agentes antiapoptóticos como la Esmifosina 1-Fosfato resulta prometedora en el futuro como método de protección. Si bien existen estudios en animales, todavía no se reportó su utilización en humanos.

Conclusiones y consideraciones finales:

En la cura del cáncer hoy por hoy debería considerarse no sólo la erradicación de la enfermedad y la sobrevida, sino también la calidad de vida posterior. En este último aspecto debemos incluir los deseos de maternidad posterior de la paciente.

Cuando se ofrece la posibilidad de preservación de fertilidad deben plantearse los distintos protocolos disponibles teniendo en cuenta la edad de la paciente, su status hormonal y las características de la enfermedad de base.

Debemos ofrecer un apropiado, seguro y potencialmente exitoso tratamiento, individualizándolo para cada paciente. En este aspecto es muy importante un correcto manejo de las expectativas y un cuidadoso asesoramiento.

Para aquellas pacientes que no consulten en los primeros días de la fase folicular existen numerosos esquemas de estimulación comenzando en distin-

tos momentos del ciclo con excelentes resultados.

En lugares o situaciones en las que no sea accesible la criopreservación, la utilización de agentes citoprotectores (como los análogos de GnRH) es una herramienta válida.

Debe tenerse en cuenta que en pacientes con cáncer la capacidad reproductiva puede estar ya comprometida por su enfermedad de base.

Es imperativo el trabajo conjunto entre oncólogos y especialistas en medicina reproductiva.

Sea cual fuere la estrategia planteada como factible, la oportunidad de preservar la fertilidad de alguna forma no debería ser negada a ninguna paciente.

Preservación de tejido ovárico. Desde el congelamiento a la vitrificación. Perspectivas y tendencias mundiales

Gabriel Álvarez

CONICET.

Facultad de Veterinaria, UBA.

Servicio de Ginecología, Sección Reproducción, Hospital Italiano de Buenos Aires.

Las diferentes estrategias de preservación de fertilidad se ofrecen a pacientes que, debido a patologías generalmente oncológicas, deberán recibir tratamientos potencialmente esterilizantes (radio o quimioterapia). La técnica que se implementa habitualmente es la estimulación ovárica para la obtención de ovocitos y su posterior criopreservación, antes de efectuar el tratamiento potencialmente esterilizante; eventualmente puede ofrecerse la criopreservación de embriones. Ahora bien, existen dos situaciones en las que no es posible aplicar esta estrategia. Es el caso de las niñas prepúberes y el de mujeres adultas, que por la condición de su patología (generalmente oncopatologías hemáticas que deben iniciar urgentemente la quimioterapia), no cuentan con el tiempo suficiente para realizar una estimulación ovárica y aspiración ovocitaria. En este contexto, la criopreservación de tejido ovárico cuenta la ventaja de poder resolverse en un tiempo muy corto (solo el tiempo que insume la laparoscopia) y constituye la única alternativa para las niñas prepúberes. Sin embargo, la congelación de tejido ovárico presenta numerosas dificultades, fundamentalmente porque se trata de una estructura con cierta complejidad, constituida por diferentes tipos celulares. Solo como

ejemplo, los folículos primordiales toleran mejor la criopreservación que los folículos con ovocitos más maduros metafase II, dado que el huso meiótico es muy sensible al calor y al estrés osmótico.

Por otro lado, existen varios puntos polémicos alrededor de esta técnica. En primer lugar, es una estrategia que aún debe considerarse como técnica experimental, y debería ofrecerse dentro del contexto de protocolos de investigación. Las tasas de eficiencia son discutibles y varían ampliamente entre los diferentes grupos de trabajo; los resultados no son uniformemente reproducibles. Otro punto aún no definido es cuál de las dos técnicas publicadas para conservar tejido ovárico es mejor: si el congelamiento lento o la vitrificación (congelamiento rápido). Durante su presentación, el Dr Gabriel Álvarez realizó una breve descripción de ambas técnicas y un análisis comparativo entre las mismas.

Actualmente, el congelamiento lento es la técnica más difundida y aceptada; aunque con esta técnica la conservación del estroma no es adecuada. En cambio, la vitrificación permite una mejor conservación del estroma y de la arquitectura ovárica en general, con una conservación de los folículos y ovocitos, al menos similar a la del congelamiento lento. Si bien el objetivo fundamental es la recuperación de los ovocitos, la conservación del estroma es muy importante para lograr la supervivencia del tejido criopreservado al ser reimplantado.

Desde el punto de vista técnico, para la criopreservación de tejido ovárico se toman finos y pequeños fragmentos de corteza ovárica debido a que la mayor concentración de folículos primordiales se encuentra en un espacio, desde la superficie a la profundidad, de 0,6 mm. Por este motivo, la mayoría coincide en que es suficiente extirpar 1 mm de tejido.

El congelamiento lento se caracteriza por un descenso controlado y gradual de la temperatura. Para ello se necesita una congeladora programable de la temperatura que va disminuyendo a 2°C / minuto hasta alcanzar los -7°C; luego a 3°C / minuto hasta los -40°C; y finalmente a 10°C / minuto hasta los -110°C para por último introducir el tejido en nitrógeno líquido. Para minimizar el riesgo de lesión por la generación de cristales de hielo y el estrés osmótico, debe utilizarse un crioprotector, generalmente a baja concentración (1,5 M). En el descongelamiento, la temperatura se eleva inicialmente a temperatura ambiente y luego se sumerge en agua hasta alcanzar los

37°C. Dado que durante la congelación el tejido se encuentra deshidratado, se requieren varios pasos para proteger a la célula del daño osmótico durante la rehidratación. Para ello se utilizan concentraciones decrecientes del mismo crioprotector, partiendo de concentraciones 1 M.

Esta técnica fue descrita en el año 1996 en Bélgica; en el año 2000 se publicó el primer trasplante exitoso de tejido ovárico criopreservado y, en 2004, el primer nacido vivo con esta técnica. En otras palabras, se necesitaron 8 años desde la descripción de la técnica para lograr el primer nacido vivo.

Se han publicado diferentes trabajos en donde se evalúa la eficiencia del congelamiento lento. Una de las últimas publicaciones sobre este tema (2013) analiza los resultados de esta técnica en 60 pacientes. Se observó una recuperación de la actividad ovárica post-reimplante del tejido ovárico mayor del 90 % (evidenciada por los dosajes hormonales y la recuperación de ciclos, lo cual no implica recuperación de la fertilidad). El tiempo de recuperación de la actividad ovárica osciló entre los 4 y 9 meses. Pero sin dudas, el dato más representativo para la evaluación de la preservación de fertilidad es el número de embarazos y nacidos vivos. Al respecto, en esas 60 pacientes se obtuvieron 18 embarazos (eficiencia de un 30%) y 12 nacidos vivos (20% de eficiencia), que deben considerarse tasas muy buenas. Es importante tener en cuenta que los datos pueden estar sesgados, ya que la revisión no aclara cuántos de esos embarazos se produjeron en una misma paciente, del mismo modo que no detalla cuántas veces debió reimplantarse el tejido criopreservado en cada paciente.

Al día de hoy hay reportados 24 nacidos vivos a partir de tejido criopreservado por congelamiento lento.

El sitio de implante puede ser *ortotópico* o *heterotópico*. El implante ortotópico es el que se realiza en la cavidad pelviana, generalmente cerca de las trompas (en el ovario remanente, en la corteza ovárica, sobre la misma trompa, en el peritoneo –más precisamente en un bolsillo peritomeal fabricado *ad hoc*- o sobre el ligamento ancho) con la idea de que las fimbrias puedan captar el ovocito en caso de ovulación. Con el implante *ortotópico* hay reportados nacimientos tanto por concepción natural como por técnicas de fertilización *in vitro*. El implante *heterotópico* es el que se ubica en el tejido subcutáneo, en diferentes lugares del cuerpo. Es

una técnica más simple, con la que la recuperación de los ciclos se alcanza de una forma más rápida. En estos casos, los ovocitos deben ser aspirados del implante (habiéndose realizado previamente una estimulación ovárica), y luego son fertilizados mediante ICSI. Con esta estrategia se ha logrado obtener embriones, aunque en ningún caso se ha conseguido un nacido vivo, con lo cual se concluye que el implante ortotópico debe favorecer por algún motivo un mejor desarrollo ovocitario.

La vitrificación es una técnica que fue desarrollada en el año 2009 por grupos japoneses y, a diferencia de la anterior, se caracteriza por una disminución violenta y sumamente rápida de la temperatura. En la vitrificación, uno de los puntos claves es el tamaño de la pieza de tejido a criopreservar: se sugiere que el grosor no supere el milímetro de espesor y la superficie no debe ser mayor de 1cm x 1cm. De hecho, la importancia del tamaño del tejido fue considerada inicialmente en la vitrificación y posteriormente fue tenida en cuenta en el congelamiento lento. Otra de las características es que utiliza varios crioprotectores, a alta concentración, en la misma solución. Inicialmente el tejido se sumerge en la solución con crioprotectores y en un segundo paso, en el medio de vitrificación. Es muy importante la utilización de soportes específicos para mantener estirada la muestra de tejido y evitar que se contraiga durante el congelamiento y aumente el espesor. Para el congelamiento, el tejido colocado en el soporte, a temperatura ambiente, se sumerge directamente en el nitrógeno líquido. Una ventaja práctica es que al momento de la vitrificación, la observación del tejido permite tener una primera aproximación del resultado del procedimiento: si el tejido presenta un aspecto vítreo, transparente, significa que el tejido se ha vitrificado correctamente; en cambio, si el tejido se ve de color blanco, indica que se han formado cristales de hielo.

Para proteger del daño osmótico a las células, la desvitrificación del tejido se hace en varios pasos, en los que se utilizan inicialmente altas concentraciones de sacarosa, las cuales van decreciendo gradualmente, para terminar con un medio de lavado isotónico, donde el tejido se recupera totalmente.

El reimplante del parche de tejido ovárico también es de importancia fundamental. Habitualmente se reimplanta sobre la superficie del ovario remanen-

te. Se trata de un reimplante avascular. Para ello se reseca un parche de la superficie ovárica del ovario remanente, y sobre esa superficie reavivada se afronta el tejido criopreservado. Se dan muchísimos puntos para fijar el tejido, prestando extrema atención a la hemostasia para evitar la formación de hematomas, con el objetivo de obtener una rápida neovascularización y perder la menor cantidad de folículos.

Desde el inicio, los resultados de esta técnica fueron comparados con los del congelamiento lento, dado que era la técnica preexistente y de referencia. Del análisis comparativo de los trabajos surge que la recuperación funcional del tejido criopreservado (determinada por dosajes de FSH y AMH) es más rápida con la vitrificación que con el congelamiento lento. Si bien la conservación de los folículos ováricos parecería ser mejor con el congelamiento lento –inclusive reflejado por niveles más altos de AMH–, la vitalidad de los ovocitos recuperados por congelamiento lento es menor que la de los recuperados por vitrificación. Otros trabajos *in vitro* muestran que la histología del tejido se mantiene en forma similar con ambas técnicas; sin embargo, la expresión de algunos genes parecería estar disminuida con la vitrificación. Algunos trabajos japoneses resaltan que con la vitrificación la preservación de folículos antrales es superior y que los niveles de apoptosis en ovocitos medidos por TUNEL son inferiores. A la fecha, solo hay reportado un solo nacido vivo con la técnica de vitrificación, comparado con los 24 nacidos por congelamiento lento. Es importante tener en cuenta que todavía no ha pasado un tiempo suficiente desde la descripción e implementación de la vitrificación como para poder comparar los resultados de este parámetro entre ambas técnicas.

Una de las líneas de investigación en la que se trabaja en forma experimental en tejido *in vitro* es la utilización de factores de crecimiento, promotores de la neovascularización y protectores de apoptosis para evitar la pérdida de folículos por la isquemia del tejido al ser reimplantado.

Concluyendo, al día de hoy ambas técnicas deben considerarse experimentales y ninguna ha demostrado ser superior a la otra. En cualquier caso, para ser ofrecidas a las pacientes deben ser aprobadas por comités institucionales. Cada laboratorio debería trabajar con la técnica que más experiencia tenga.

Queda en agenda determinar:

- Cuál es la eficiencia real en cuanto a la recuperación de la fertilidad.
- Cuál es el mejor lugar (ovario remanente, bolsillo peritoneal) y técnica para reimplantar el tejido criopreservado.
- Poder determinar si existe algún efecto beneficioso del tejido reimplantado sobre la recuperación del tejido ovárico remanente y poder identificar, en los casos que ha habido ovulación, si la misma ha ocurrido a partir del tejido reimplantado o del ovario remanente.
- En el caso de pacientes oncológicas, cuál es el riesgo de reintroducción de células malignas.

Espermatogénesis *in vitro* y generación de espermatozoide artificiales. ¿Qué sabemos hoy?

Cristian Álvarez Sedó

CEGYR.

La espermatogénesis es un proceso extremadamente complejo que involucra numerosos eventos que llevan a que una célula grande, con poca movilidad y un número diploide de cromosomas, se transforme a una célula pequeña, elongada, con alta movilidad, con un número haploide de cromosomas y con capacidad fecundante. Sería sumamente extenso detallar cada uno de los eventos que se producen durante la espermatogénesis y que conducen a los cambios en la morfología del espermatozoide y a nivel cromosómico. Clásicamente, la gametogénesis parte de la espermatogonia (compartimiento germinal), y pasa por diferentes estadios -espermatoцитos primario y secundario (compartimiento meiótico), espermátide redonda y espermátide elongada (compartimiento de maduración y diferenciación celular)- para llegar finalmente al espermatozoide. El Dr Sedó enumeró los principales eventos que ocurren durante la espermiogénesis, es decir, el proceso por el cual las espermátidas se convierten en *espermatozoides*: desarrollo del acrosoma, elongación del núcleo, condensación de la cromatina, formación del flagelo, migración de mitocondrias y reducción del citoplasma. En paralelo a los cambios morfológicos celulares ocurren numerosos cambios en la cromatina. Para lograr la haploidización es necesario que se produzcan procesos complejos como la replicación del ADN y luego la

división celular por meiosis; asimismo, se produce recombinación de ADN, proceso fundamental que permite lograr la diversidad de la especie. En cada paso de un estadio celular a otro ocurren mecanismos de reparación del ADN. Aún después de la meiosis, los cambios en el ADN continúan. La protaminación, por ejemplo, consiste en el reemplazo de las histonas que están asociadas al ADN por protaminas. Este cambio permite la compactación del ADN, lo cual facilita la motilidad del espermatozoide y ayuda a proteger el ADN. Asimismo, en estas etapas ocurren fenómenos epigenéticos, es decir, fenómenos que no afectan la secuencia del ADN de los genes, pero que sí varían su expresión y permiten la reprogramación del ADN. Entre los mecanismos epigenéticos que pueden afectar la función genómica se incluyen la organización espacial del ADN alrededor de las histonas y la marcación bioquímica (metilación, acetilación principalmente). Estos cambios epigenéticos son responsables del silenciamiento del genoma espermático durante las primeras etapas del genoma embrionario, transcripcionalmente hablando. El Dr Sedó planteó esta breve introducción para entender el tremendo desafío que constituye desarrollar la espermatogénesis *in vitro* y generación de espermatozoides artificiales: no se trata simplemente de conseguir una célula con flagelo.

En segundo lugar, el Dr Álvarez Sedó planteó diferentes situaciones en las que la producción espermática puede verse comprometida, debido a determinadas patologías o como consecuencia de los tratamientos. En este contexto, la posibilidad de conseguir espermatozoides artificiales permitiría la reproducción masculina. Una de las situaciones más frecuentes son las patologías oncológicas, que deben recibir radio y/o quimioterapia. Se sabe que las células germinales son las más sensibles: la exposición a una radiación $\leq 0,1$ gy puede ya causar oligozoospermia; una radiación de 0,35 gy produce azoospermia, que puede llegar a ser reversible; sin embargo, las células de Leydig necesitan 12 gy para afectar su función. La quimioterapia con agentes alquilantes también causa daño testicular de manera dosis-dependiente.

Los daños pueden ocurrir a diferentes niveles, dando lugar a cuadros diversos:

1. Que exista producción espermatogénica completa, pero los zoides no puedan ser liberados.

2. Que ocurra arresto o detención en estadio de espermátide redonda.
3. Que se produzca detención de la espermatogénesis en estadio de espermatocito.
4. Que se produzca detención a nivel de espermatogonias.
5. Que la noxa determine ausencia de toda la línea germinal.

En cualquier caso, en la actualidad los pacientes deben recibir asesoramiento sobre las estrategias de preservación de fertilidad. La principal estrategia en niños pospuberales, jóvenes y adultos, es la criopreservación de espermatozoides, obtenidos por eyaculación. Sin embargo, en niños prepúberes, la única alternativa es la criopreservación de tejido testicular, aunque esto implica no contar con la espermatogénesis completa. Por ello, la espermatogénesis *in vitro* suena muy promisorio en el área de la preservación de fertilidad. Lamentablemente, los logros en este campo -especialmente en humanos- son muy limitados, a pesar de los innumerables intentos que han hecho distintos grupos en todo el mundo. En varias editoriales surge la pregunta si la espermatogénesis *in vitro* deber considerarse realidad o ciencia ficción.

La mayor parte de los trabajos se han llevado a cabo en animales. El principal avance de estas investigaciones es haber identificado marcadores celulares específicos de cada estadio de la espermatogénesis. Estos marcadores celulares servirían para ejecutar trabajos de investigación con el objetivo de desarrollar un espermatozoide haploide con capacidad fecundante, al poder seguir estos marcadores a lo largo de toda la línea experimental.

En estos estudios, desarrollados especialmente en roedores, se han intentado diferentes estrategias: utilizar células embrionarias *stem cells* o utilizar diferentes tipos de células somáticas. Solo algunos grupos llegaron a obtener espermatogonias, otros llegaron a haploidizar células y desarrollar células *tipo* espermatozoides, apenas un par de grupos logró desarrollar embriones de ratón *in vitro*, mientras que solo un grupo llegó a obtener nacimiento de crías en ratones.

En otra línea, un grupo de investigadores inyectó células germinales en testículos de ratones durante su etapa embrionaria. Estos testículos fueron retirados en diferentes estadios del desarrollo embrionario para observar su histología. Se observó

que las células germinales microinyectadas invadían los túbulos seminíferos vacíos y colonizaban el epitelio seminífero, y evolucionaban hacia la haploidización dando lugar a la generación de células muy parecidas a espermatozoides ratón, con las que pudieron obtener crías con el procedimiento de ICSI. En realidad, en estas investigaciones no se lograron modificaciones en la célula, porque en realidad se trató de un “trasplante” de células germinales.

Otra estrategia ha sido la del xenotrasplante: se trasplantó tejido testicular de cerdo en ratones desnudos castrados, una especie de ratones usados a menudo en investigación, dado que tienen un sistema inmunitario defectuoso, por lo cual no rechazan las células de otras especies. Con esta estrategia se pudo observar, al hacer cortes histológicos del tejido trasplantado, que se producía una *haploidización inducida*, obteniéndose los distintos estadios de la espermatogénesis, y que el tejido era capaz de producir y secretar hormonas (inhibina y testorena). Los espermatozoides fueron fecundados mediante ICSI y se logró obtener cinco crías de cerdo.

Teniendo en cuenta la importancia de las células de Sertoli y la matriz extracelular en la espermatogénesis, otros investigadores utilizaron cultivos celulares en 3D, para imitar estrechamente el microambiente de los túbulos seminíferos y demostrar justamente la importancia de las interacciones entre estas células, las células germinales y la matriz extracelular. En estos experimentos pudo lograrse la implantación de células germinales y comprobar su actividad.

En humanos, los diferentes intentos partiendo de células *stem cell* han logrado en contados casos llegar solamente a la haploidización, pero no se ha logrado avanzar en el desarrollo embrionario.

Teniendo como base estos experimentos, lo que se podría hacer a futuro en individuos afectados por cáncer, en quienes se ha criopreservado de tejido testicular, es trasplantar el tejido testicular para que las células germinales colonicen *la rete testis*, con el objetivo de lograr la producción de espermatozoides *in vivo* o eventualmente completar la espermatogénesis *in vitro*. El riesgo principal de la primera estrategia es la posibilidad de inyectar células malignas al trasplantar el tejido testicular; por tal motivo, sería necesario “purificar” en el tejido disgregando las células germinales, con lo cual ya no sería un trasplante de tejido sino la microinyección de células.

Otras investigaciones realizadas en células humanas lograron desarrollar la meiosis *in vitro* y

con ello, obtener espermátides redondas, comprobado esto con los marcadores celulares característicos de este estadio de la espermatogénesis. En algunos casos se ha logrado observar desarrollo del acrosoma, lo cual demuestra que podría alcanzarse el desarrollo espermático más allá de la haploidización. Una cuestión importante es si existe la posibilidad de conseguir embarazo con la microinyección de espermátides. En trabajos previos, se ha demostrado que sí es posible esta alternativa; sin embargo, las tasas de fecundación y de embarazo clínico han sido muy bajas. Por ejemplo, con la microinyección de espermátides redondas, se ha reportado una tasa de fecundación del 21% por ICSI y 2,8% de tasa embarazo clínico, mientras que con la microinyección de espermátides elongadas, se ha logrado una tasa de fecundación de 48% con una tasa de embarazos del 28%.

Obviamente, a la hora de aplicar estos experimentos en la clínica, surgen una serie de cuestionamientos que van más allá de los cambios morfológicos celulares y que tienen que ver con ciertos aspectos genéticos de la espermatogénesis, como el *imprinting*. Se desconoce si al producir estos desarrollos *in vitro* ocurren todos los mecanismos de *imprinting*, es decir, de encendido y apagado de genes que son fundamentales para la reprogramación del ADN del embrión. Asimismo, se plantean los riesgos potenciales de las diferentes estrategias: la posibilidad de reintroducir células malignas al trasplantar el tejido testicular criopreservado o la posibilidad de introducir virus del huésped al utilizar el xenotrasplante.

Concluyendo, hay que considerar que la espermatogénesis *in vitro* se encuentra en etapa plenamente experimental. Aun así, hay quienes confían que la combinación de las tecnologías reproductivas ya establecidas con las nuevas tecnologías emergentes podrá dar lugar a la síntesis de un espermatozoide saludable, que pueda fecundar y generar una descendencia normal.

Hasta el momento, los trabajos en humanos solo han conseguido alcanzar la haploidización celular. Quedan como desafíos pendientes asegurar la normalidad citogenética y la estabilidad epigenética del “espermatozoide artificial”, solucionar el tema del potencial tumorigénico de las células germinales reimplantadas, y responder diversos cuestionamientos éticos de estas técnicas.