

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



Trasplante de células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) para promover desarrollo folicular en tejido ovárico previamente dañado por quimioterapia

TRABAJO FINAL DE GRADO
Curso Académico: 2016/2017

Autor: **María Marchante Cuevas**
Tutor académico: **Prof. D. José Salvador Vicente Antón**
Tutores externos: **Dña. Sonia Herraiz Raya; D. César Díaz García**

Valencia, Junio 2017



TÍTULO

Trasplante de células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) para promover desarrollo folicular en tejido ovárico previamente dañado por quimioterapia.

RESUMEN

El envejecimiento, la baja respuesta ovárica y otras condiciones de daño adquirido como los tratamientos oncológicos alteran la función ovárica. Sin embargo, incluso cuando los ovarios dañados pierden su capacidad de ovulación, puede quedar una reserva residual de folículos quiescentes que podrían ser rescatados y desarrollarse, en un nicho ovárico adecuado, dando lugar a ovocitos maduros. La infusión de células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) podría proporcionar un ambiente ovárico óptimo para mantener y promover el crecimiento folicular. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar los efectos regenerativos de la infusión de BMDSC humanas en los ovarios de ratones dañados por quimioterapia.

Para alcanzar dicho objetivo, hembras de la cepa NOD-SCID se trataron con una dosis reducida y otra estándar de quimioterapia (Busulfan y Ciclofosfamida) con el fin de dañar su función ovárica y simular situaciones de Bajas Respondedoras (PR) e Insuficiencia Ovárica Prematura (POI), respectivamente. Después, se les inyectó PBS (grupo control) o BMDSC obtenidas mediante aféresis de pacientes PR tras su movilización con G-CSF. A lo largo del experimento se evaluó el ciclo estral y peso de las ratonas. Además, los animales fueron estimulados con gonadotropinas y una parte se cruzaron con machos fértiles para evaluar la descendencia o sacrificarlos y recuperar ovocitos/embriones, mientras que el resto fueron sacrificados para recuperar los ovarios y evaluar el estado del nicho ovárico (vascularización, proliferación y apoptosis).

Una vez realizado el estudio, se observó que la infusión de BMDSC promovió el crecimiento folicular a los estadios antral y preovulatorio en los ovarios de los ratones que imitaban situaciones de PR y POI. Después de la estimulación ovárica, el número de ovocitos MII, el de embriones de 2-células y el tamaño de las camadas también aumentaron con la inyección de BMDSC. Por último, al examinar el estroma ovárico, se detectó que las BMDSC mejoraban la densidad de microvasos y la proliferación celular, y reducían la apoptosis en ambas condiciones estudiadas.

Por lo tanto, la infusión de BMDSC podría considerarse una alternativa para mejorar el desarrollo folicular en pacientes con una función ovárica alterada y una baja reserva folicular.

PALABRAS CLAVE

Infertilidad, PR, POI, BMDSC, desarrollo folicular, nicho ovárico, rejuvenecimiento ovárico.

SUMMARY

Aging, poor ovarian response and other damaging-acquired conditions like oncologic treatments, lead to an impaired ovarian function. Nevertheless, even when damaged ovaries lose their ability to ovulate, they might contain a residual pool of quiescent follicles that could be rescued and developed, in a suitable ovarian niche, giving rise to mature oocytes. Infusion of bone marrow-derived stem cells (BMDSC) could provide an adequate ovarian environment to maintain and promote follicular growth. Therefore, the aim of the present study consisted in assessing regenerative effects of human BMDSC on chemotherapy-damaged ovaries in mice.

In order to reach this objective, females of the NOD-SCID strain were treated with a reduced or a standard chemotherapy dosage (Busulfan and Cyclophosphamide) to damage the ovarian function and mimic situations of Poor Responder (PR) and Premature Ovarian Insufficiency (POI), respectively. Then, animals of each dose were injected (via tail vein) with PBS (Control groups) or BMDSC obtained by aphaeresis from Poor Responder women after G-CSF mobilization. Estrous cycle and body weight were monitored daily. Furthermore, animals were stimulated with gonadotropins and one part was mating with fertile males to evaluate offspring or to sacrifice and recover oocytes/embryos, while the rest were sacrificed to recover the ovaries and evaluate the status of the ovarian niche (vascularization, proliferation and apoptosis).

After the study, it was observed that infusion of BMDSC promoted follicular growth to the antral and pre-ovulatory stages in mice ovaries mimicking PR and POI. After ovarian stimulation, the number of MII-oocytes and 2-cell embryos and the size of the litters was also increased. Finally, when ovarian stroma was examined, an improvement in micro-vessel density and cell proliferation, together with a decrease in apoptosis were detected after BMDSC in both conditions studied.

Therefore, BMDSC infusion could be considered an alternative to improve follicular development in patients with an impaired ovarian function.

KEY WORDS

Infertility, PR, POI, BMDSC, follicular development, ovarian niche, ovarian rejuvenation.

DATOS DEL TRABAJO

Alumna: Dña. María Marchante Cuevas

Tutor académico: Prof. D. José Salvador Vicente Antón

Tutores externos: Dña. Sonia Herraiz Raya; D. César Díaz García

Valencia, Junio 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer a la Dra. Sonia Herraiz y al Dr. César Díaz la posibilidad de realizar el trabajo final de grado junto a ellos en el Instituto de Investigación Sanitario de La Fe. Gracias Sonia por toda la ayuda prestada, por transmitirme el entusiasmo por la Medicina Reproductiva así como el ejemplo del trabajo bien hecho. Ha sido un placer formar parte de vuestro equipo.

Gracias al Catedrático Dr. José S. Vicente, por aceptar ser mi tutor y estar siempre disponible cuando he necesitado de su ayuda o consejo. Profesores como usted consiguen que los alumnos se apasionen con cada asignatura, se esfuercen y traten de dar lo mejor de ellos mismos.

También quería agradecerle a Anna Buigues todo lo que me ha enseñado día a día en el laboratorio, gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado. Ha sido para mí el ejemplo de biotecnóloga a seguir, tanto en lo profesional como en lo personal.

Por último, agradecer a amigos y familiares, protagonistas indiscutibles de estos cuatro años de grado. Gracias por haber celebrado conmigo los éxitos alcanzados y estar como apoyo fundamental en los momentos de debilidad.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Diseño del estudio.....	8
3.2 Obtención de BMDSC.....	9
3.3 Marcaje celular.....	9
3.4 Modelo animal.....	9
3.5 Monitorización del ciclo estral.....	10
3.6 Recuperación de ovocitos y embriones del oviducto.....	11
3.7 Recuperación y procesamiento de los ovarios.....	11
3.8 Localización de las células inyectadas en los ovarios.....	12
3.9 Recuentos foliculares.....	13
3.10 Proliferación celular.....	13
3.11 Apoptosis.....	14
3.12 Densidad microvascular (MVD).....	15

3.13 Evaluación de la descendencia.....	16
3.14 Estadística.....	16
4. RESULTADOS	
4.1 Peso de los ratones tras el tratamiento con quimioterapia y monitorización del ciclo estral.....	17
4.2 Peso corporal y ovárico al final del experimento.....	18
4.3 Localización de las BMDSC.....	20
4.4 Efecto de la inyección celular en el desarrollo folicular.....	20
4.5 Efecto del tratamiento con BMDSC sobre la fertilidad.....	22
4.6 Vascularización.....	24
4.7 Proliferación celular y apoptosis.....	25
4.8 Efecto del tratamiento con BMDSC sobre la descendencia.....	27
5. DISCUSIÓN.....	28
6. CONCLUSIONES.....	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Foliculogénesis y evolución de la reserva ovárica.	1
Figura 2. Causas de baja reserva folicular y niveles de AMH.	4
Figura 3. Células madre derivadas de la médula ósea.	5
Figura 4. Esquema del diseño experimental de los efectos regenerativos de BMDSC en un modelo de ratón con daño ovárico inducido por quimioterapia. ...	8
Figura 5. Representación de cada fase del ciclo estral.	11
Figura 6. Ovocitos en las diferentes fases del desarrollo folicular.	13
Figura 7. Pérdida de peso corporal de los ratones tras administrar ambas dosis de quimioterapia.	17
Figura 8. Monitorización del ciclo estral de los ratones tras la quimioterapia y tratamiento con BMDSC.	18
Figura 9. Peso corporal y ovárico.	19
Figura 10. Secciones de ovario de cada grupo experimental.	19
Figura 11. Tinción Prussian Blue en secciones de ovario.	20
Figura 12. Recuento folicular en muestras de ovarios tratados con BMDSC en comparación a los grupos control tras EOC.	21
Figura 13. Resultados de fertilidad.	23
Figura 14. Evaluación de la vascularización.	24
Figura 15. Evaluación de la proliferación celular.	25
Figura 16. Ensayo TUNEL.	26
Figura 17. Fotografía de las crías de ratón en el primer día tras su nacimiento..	27

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Pases realizados para la inclusión de las muestras en parafina.	12
Tabla 2. Ovocitos MII y embriones recuperados del oviducto tras la EOC y el cruce con machos fértiles.	22
Tabla 3. Número de embarazos y crías de ratón obtenidas.	27

ABREVIATURAS

AMH: Hormona anti-Mülleriana, del inglés Anti-Müllerian Hormone

BMDSC: Células madre derivadas de la médula ósea, del inglés Bone Marrow Derived Stem Cells

Bu: Busulfan

CG: Células de la Granulosa

CL: Cuerpos lúteos

Cy: Ciclofosfamida, del inglés Cyclophosphamide

d: Día

D: Diestro

EOC: Estimulación ovárica controlada

E: Estro

FSH: Hormona folículo estimulante, del inglés Follicle Stimulating Hormone

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos, del inglés Granulocyte Colony Stimulating Factor

hCG: Gonadotropina coriónica humana, del inglés human Chorionic Gonadotropin

H&E: Hematoxilina y Eosina

IB4: Isolectina B4

IP: Intraperitoneal

M: Metaestro

MIRB: Ion Molday Rhodamine B

MVD: Densidad microvascular, del inglés Microvascular Density

n: Número

NS: No significativo

P: Proestro

PR: Bajas respondedoras, del inglés Poor Responder

PBS: Tampón fosfato salino, del inglés Phosphate Buffer Saline

PFA: Paraformaldehído

PMSG: Gonadotropina sérica de yegua preñada, del inglés Pregnant Mare's Serum Gonadotropin

POI: Insuficiencia ovárica prematura, del inglés Primary Ovarian Insufficiency

TA: Temperatura Ambiente

TMO: Trasplante de Médula Ósea

TdT: Desoxinucleotidil-transferasa terminal, del inglés Terminal deoxyribonucleotidyl Transferase

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

0.1xChT: Dosis reducida de quimioterapia

1xChT: Dosis estándar de quimioterapia

α -sma: alpha-smooth muscle actine

*****: Estadísticamente significativo ($p < 0.05$)

1. INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema de salud que afecta al 15% de las mujeres europeas en edad reproductiva (Evers, 2002), las cuales deben recurrir a las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) para alcanzar la maternidad.

La fertilidad de las mujeres disminuye con la edad, iniciándose un declive de la función ovárica a partir de los 30 años que desemboca en fallo ovárico alrededor de los 51 años de edad (Richardson et al., 2014). Los cambios socioeconómicos, que ha experimentado nuestra sociedad en los últimos años, han retrasado el momento en el que las mujeres desean llevar a cabo su proyecto reproductivo. Tal es así que, actualmente, la edad de las pacientes se ha convertido en una de las principales causas de infertilidad pues, como es bien sabido, con la edad disminuye no solo la calidad sino también la cantidad de ovocitos (Munné et al., 2002).

En el momento del nacimiento cada ovario humano contiene alrededor de 400.000 folículos primordiales, que constituyen la reserva ovárica o folicular, la cual es limitada y no renovable. Una vez alcanzada la pubertad, mecanismos intraováricos desconocidos activan un conjunto de folículos primordiales en cada ciclo menstrual (aproximadamente 1.000/mes), que inician su crecimiento y maduración (Zhang et al., 2014). Cada folículo quiescente mantiene la capacidad de desarrollarse aunque algunos pueden morir en estado durmiente (Tingen et al., 2009).

El proceso de la foliculogénesis se produce cada mes hasta que la mujer alcanza la menopausia, momento en el que tiene lugar el agotamiento folicular al quedar menos de 1.000 folículos en el ovario (Macklon y Fauser, 1999). Este proceso comprende diferentes fases por las que el folículo va avanzado desde un estado primordial quiescente inicial, donde el ovocito se encuentra rodeado de una capa aplanada de células de la granulosa en estado durmiente. Cuando un folículo primordial es activado, las células de la granulosa (CG) empiezan a dividirse y cambian su morfología de aplanadas a cuboidales, pasando al estadio de folículo primario. Con la continua división de las CG, se alcanza el estado de folículo preantral en los que el ovocito se encuentra rodeado por varias capas de CG. La secreción de líquido folicular forma la cavidad antral característica de los folículos antrales y preovulatorios. Finalmente, una vez liberado el ovocito, se forman los cuerpos lúteos (CL), encargados de la secreción de progesterona en caso de que el ovocito sea fecundado (Vital-Reyes, 2010). Del conjunto de folículos reclutados en cada ciclo menstrual, la mayoría entrará en atresia, y solo alguno de ellos conseguirá alcanzar el estado preovulatorio (Greenwald, 1972).

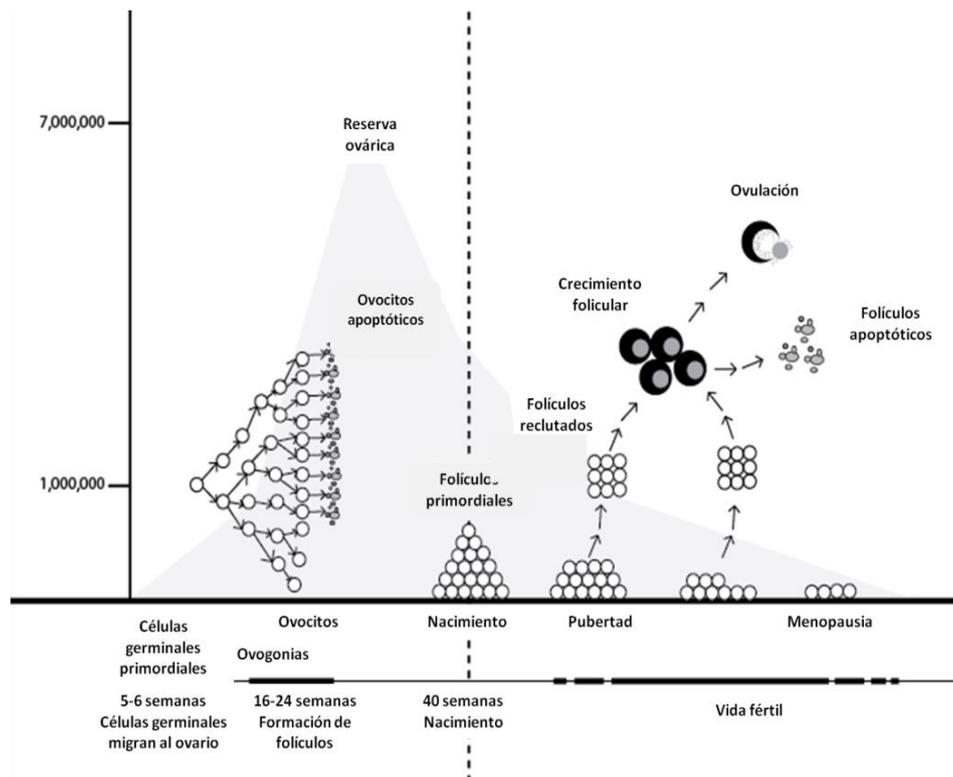


Figura 1. Foliculogénesis y evolución de la reserva ovárica. Figura modificada de Mcgee y Hsueh (2000).

El proceso natural de envejecimiento ovárico se caracteriza por un declive progresivo de la cantidad de folículos unido a un descenso en los niveles séricos de la hormona anti-Mülleriana (AMH), producida predominantemente por las CG de folículos secundarios y antrales tempranos (Kelsey et al., 2011). Por tanto, la reserva ovárica puede ser evaluada midiendo los niveles séricos de AMH y realizando un recuento de folículos antrales. Ambos marcadores son considerados, actualmente, como los mejores y más fiables de la reserva ovárica (La Marca et al., 2010) (Figura 2A).

El problema de la baja reserva folicular no se asocia únicamente a la edad. Así, hay determinadas condiciones donde el declive progresivo de la reserva y la función ováricas se ven acelerados. Este podría ser el caso de las pacientes bajas respondedoras (PR), las cuales representan un 10-25% de las mujeres que requieren TRA (Pellicer et al., 1998). Estas pacientes se caracterizan por tener una respuesta inadecuada a la estimulación ovárica, generalmente debido a que presentan una baja reserva folicular, independientemente de la edad (Figura 2B).

Otro ejemplo de alteración del proceso normal de envejecimiento ovárico es la insuficiencia ovárica prematura (POI), donde las pacientes presentan amenorrea, y por tanto menopausia antes de los 40 años de edad. La POI afecta aproximadamente a un 1% de mujeres en la población general (Goswami y Conway, 2005), y sus causas incluyen defectos genéticos y cromosómicos, patologías autoinmune, infecciones, cirugía, causas idiopáticas sin identificar y tratamientos esterilizantes como dosis altas de quimioterapia (Visser et al., 2012) (Figura 2C). Los tratamientos quimioterapéuticos tienen efectos deletéreos sobre el ovario perjudicando a la maduración de los folículos. Afectan de forma directa a las células en división (CG y folículos primordiales), e indirectamente destruyen parte de la población folicular debido a la pérdida del feedback negativo ejercido por los folículos en crecimiento sobre la activación de primordiales (Kalich-Philosoph et al., 2013). Dado que la incidencia de cáncer en nuestra sociedad continúa aumentando y, en los últimos años, las tasas de supervivencia en niños y adolescentes se han incrementado notablemente (McVie, 1999), cada vez es mayor el número de pacientes pediátricas y adolescentes que llegan a la edad reproductiva y no pueden satisfacer su deseo de ser madres. Un 6.4 % de pacientes con cáncer de mama, el más frecuente en mujeres (Jemal et al., 2004), son menores de 40 años y no podrán tener hijos (Van Balen et al., 1997) tras superar la enfermedad, debido al efecto gonadotóxico del tratamiento oncológico (Meirow, 2000; Larsen et al., 2003).

Todas estas pacientes, que tienen en común problemas de fertilidad asociados a una reserva ovárica deficiente, siguen representando un reto clínico pues aunque existen diversas intervenciones terapéuticas dirigidas a incrementar su potencial reproductivo (Kyrou et al., 2009; Pandian et al., 2010), hasta la fecha todas presentan una eficacia limitada y poco reproducible. Esto se debe principalmente a que estas estrategias están enfocadas en el proceso de estimulación hormonal (aumento de las dosis de Hormona Folículo Estimulante (FSH), administración de FSH en fase lútea, uso de FSH recombinante en lugar de urinaria purificada etc.) pero en estas pacientes no hay folículos susceptibles de ser estimulados. Por lo tanto, actualmente la única alternativa clínica real a la que pueden optar dichas mujeres es a la donación de ovocitos u ovodonación. La ovodonación permite que las mujeres alcancen la maternidad independientemente de la edad o el estado ovocitario, sin embargo, no es una opción adecuada en todos los casos ya que puede ser aceptada o no, dependiendo de la moral, ética y religión de cada paciente.

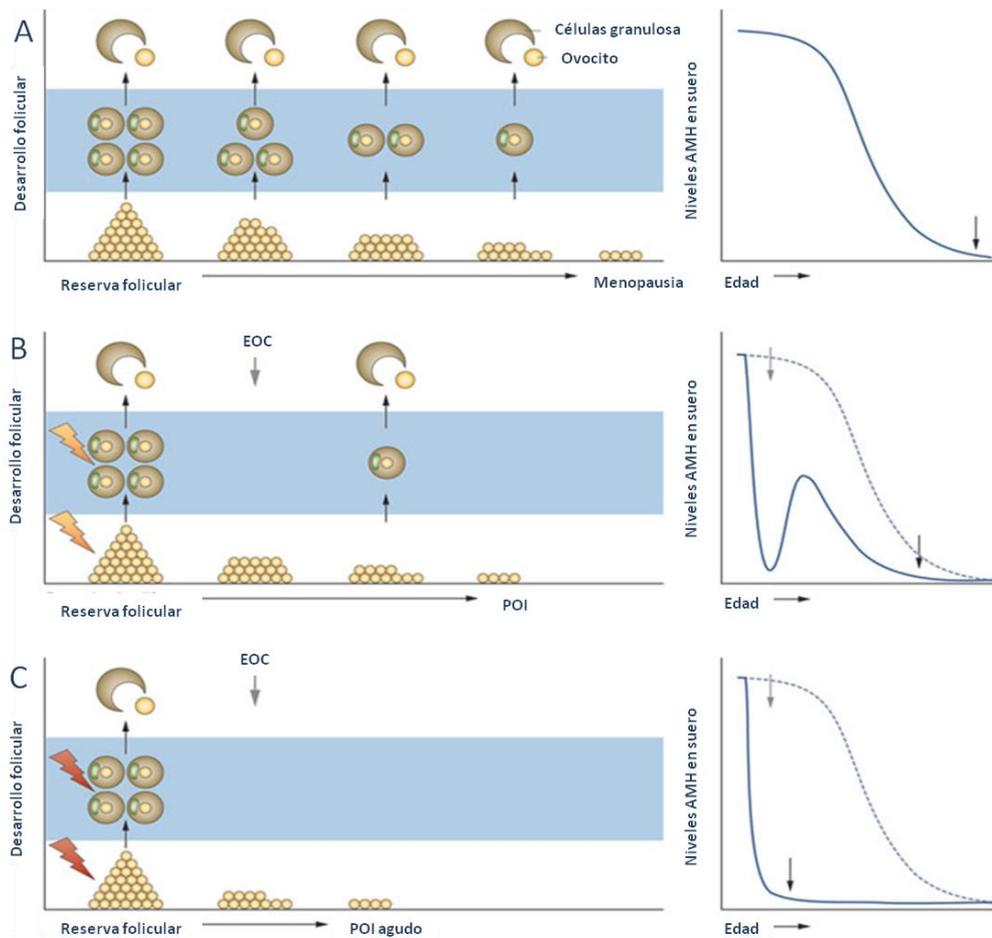


Figura 2. Causas de baja reserva folicular y niveles de AMH. A. Declive en la reserva ovárica y niveles de AMH que se producen con la edad (envejecimiento ovárico normal). B. Envejecimiento ovárico discontinuo como el observado en PR u otras causas indeterminadas C. Esquema de la función ovárica en casos de POI debida al tratamiento con quimioterapia. Figura modificada de Visser et al. (2012).
Abreviaturas: AMH, hormona anti-Mülleriana; EOC, estimulación ovárica controlada; PR, bajas respondedoras; POI, insuficiencia ovárica prematura.

Estudios recientes han demostrado que existen folículos residuales en el ovario de pacientes con POI que pueden ser activados mediante tratamientos de activación in vitro y fragmentación, obteniéndose ovocitos maduros capaces de dar lugar a niños sanos. Dicho enfoque podría ser útil para mejorar el potencial reproductivo de mujeres sometidas a tratamientos quimioterapéuticos u otras condiciones de baja reserva ovárica, en las que, incluso cuando el ovario pierde su función y capacidad de ovular, permanecen un pequeño grupo de folículos susceptibles de ser rescatados (Kawamura et al., 2013; Zhai et al., 2016).

En este sentido, se ha observado que en pacientes con POI, debido a tratamientos oncológicos, el Trasplante de Médula Ósea (TMO) parece tener un efecto positivo sobre el ovario (Salooja et al., 1994; Sanders et al., 1996; Salooja et al., 2001; Henshlang y Schuster, 2002; Veitia et

al., 2007), tal y como demuestran los numerosos embarazos espontáneos descritos. Este es, por ejemplo, el caso descrito por Veitia et al. (2007), donde una paciente tras recibir altas dosis de quimioterapia, radioterapia y posterior TMO, sufriendo amenorrea durante 6 años, dio a luz a un bebé sano años después del trasplante. Este estudio pone de manifiesto que la quimioterapia no destruye por completo la reserva ovárica, sino que quedan algunos folículos residuales, que en un ambiente o nicho ovárico adecuado pueden ser recuperados para su crecimiento y maduración. La importancia del nicho ovárico para el crecimiento folicular es apoyada además por el estudio de Niikura et al. (2009), en el que al exponer tejido ovárico viejo en un entono joven se incrementaba el número de folículos.

La médula ósea es rica en células madre, las cuales pueden dividirse en dos poblaciones: células madre hematopoyéticas que pueden dar lugar a todos los tipos de células sanguíneas, y las células madre mesenquimales con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos celulares incluyendo osteocitos, condrocitos, adipocitos, hemocitoblastos, mastocitos, y fibroblastos (Astori et al., 2010).

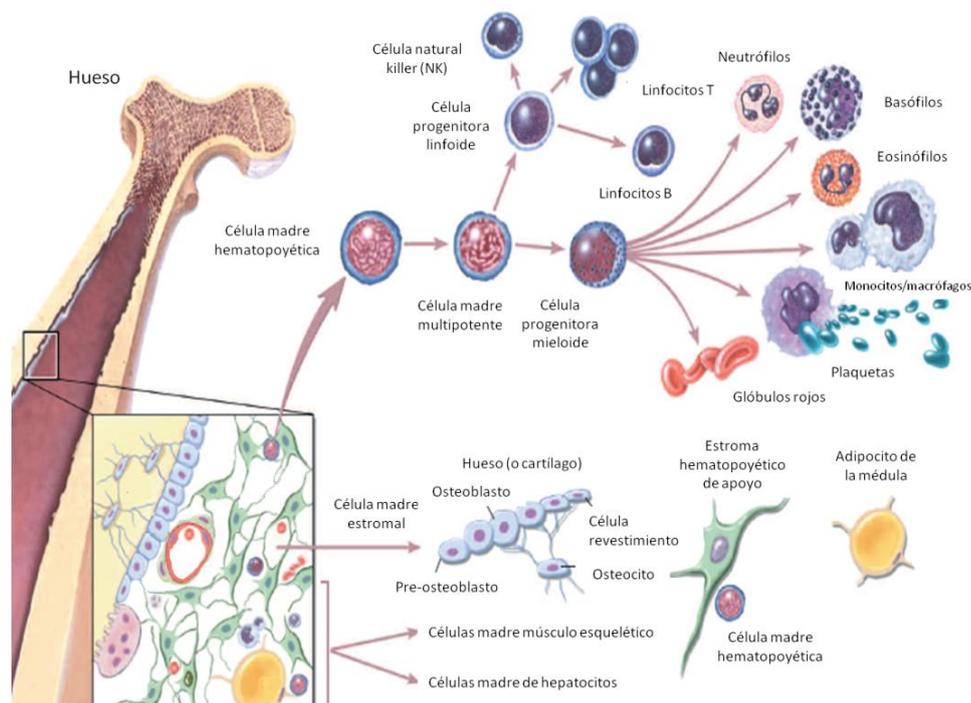


Figura 3. Células madre derivadas de la médula ósea. Figura modificada de Stemcells.nih.gov (2016). © 2008 Terese Winslow.

Estas células madre podrían ser las responsables de los efectos positivos del TMO sobre el ovario. De hecho, previamente se ha demostrado que la administración de células madre adultas de diversos tipos y orígenes como mesenquimales, endometriales, menstruales,

adiposas y hematopoyéticas, es capaz de restaurar la función ovárica en ratones con POI inducido por quimioterapia (Lee et al., 2007; Abd-Allah et al., 2013; Lai et al., 2013; Lai et al., 2015; Wang et al., 2017). Sin embargo, en todos estos estudios, el tipo de células madre adultas utilizado requiere de una selección y cultivo antes de su utilización, lo que puede resultar una limitación a la hora de trabajar con ellas. Además, en algunos casos se carece de una fuente de células autólogas (ej. células menstruales en mujeres con POI). Pero estas limitaciones podrían ser solucionadas cuando se recurre a las células madre derivadas de la médula ósea (BMDSC).

Además, se ha descrito que la subpoblación CD133+ de las BMDSC (las más inmaduras dentro de las células madre hematopoyéticas (Peichev et al., 2000)), posee propiedades regenerativas en el endometrio, promoviendo la proliferación celular y neoangiogénesis (Cervello et al., 2015). En base a este estudio, y puesto que el desarrollo folicular se relaciona con la angiogénesis, jugando ésta un gran papel en la vida del folículo (Fraser, 2006), los efectos de las BMDSC podrían ser importantes en el ovario. El nicho ovárico tiene la capacidad de atraer nuevas células indiferenciadas de otros órganos, específicamente de la médula ósea en un proceso conocido como "homing", restaurando así la estructura y función del ovario (Liu et al., 2014).

De acuerdo con todo lo anterior descrito, la hipótesis del presente trabajo final de grado es analizar si la infusión de BMDSC podría ser una estrategia terapéutica para regenerar el nicho ovárico de pacientes mayores o con una baja reserva, al permitir o favorecer la capacidad del mismo de activar y mantener el crecimiento de los folículos primordiales durmientes que quedan en él.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo final de grado consiste en reproducir, en un modelo animal, situaciones clínicas en las que el número de folículos en crecimiento se encuentra disminuido, tales como pacientes POI o PR, con el fin de estudiar si el trasplante de BMDSC es capaz de rescatar los folículos quiescentes residuales en los ovarios de este modelo animal y permitir la obtención de ovocitos competentes.

Objetivos secundarios:

- Establecer modelos animales que mimeticen situaciones de POI y BR.
- Estimar el efecto de la infusión de BMDSC sobre el ciclo estral.
- Valorar la capacidad de las BMDSC de promover el desarrollo folicular, ovulación y fecundación.
- Analizar el efecto de las BMDSC sobre el potencial reproductivo y las crías obtenidas.
- Evaluar los efectos de la infusión de dichas células sobre el nicho ovárico: análisis de la proliferación, vascularización y apoptosis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

En primer lugar, se trataron hembras NOD-SCID con quimioterapia para dañar su función ovárica. El tratamiento consistió en una dosis reducida de quimioterapia (0.1xChT) con la que mimetizar situaciones de PR, y otra estándar (1xChT) que representa situaciones de POI, ya que con dicha dosis se alcanza la esterilidad completa sin causar la muerte del animal (Generoso et al., 1971; Batchvarov et al., 2016). Después, se les inyectó a través de la vena de la cola, tampón fosfato salino (PBS) (grupo control) o BMDSC (grupo BMDSC). Las BMDSC se obtuvieron de pacientes PR mediante aféresis tras su movilización con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Para evaluar el efecto regenerativo de las BMDSC, se monitorizó diariamente el ciclo estral y el peso de los ratones a lo largo el experimento. Además, tras inducir una estimulación ovárica controlada (EOC), una parte de los animales se emparejaron con machos fértiles para estudiar la descendencia de las ratonas, y para sacrificarlas y recuperar los ovocitos /embriones y así evaluar la tasa de ovulación mientras que el resto, fueron sacrificados para recuperar los ovarios y analizar el desarrollo folicular, la vascularización, la proliferación y la apoptosis celular.

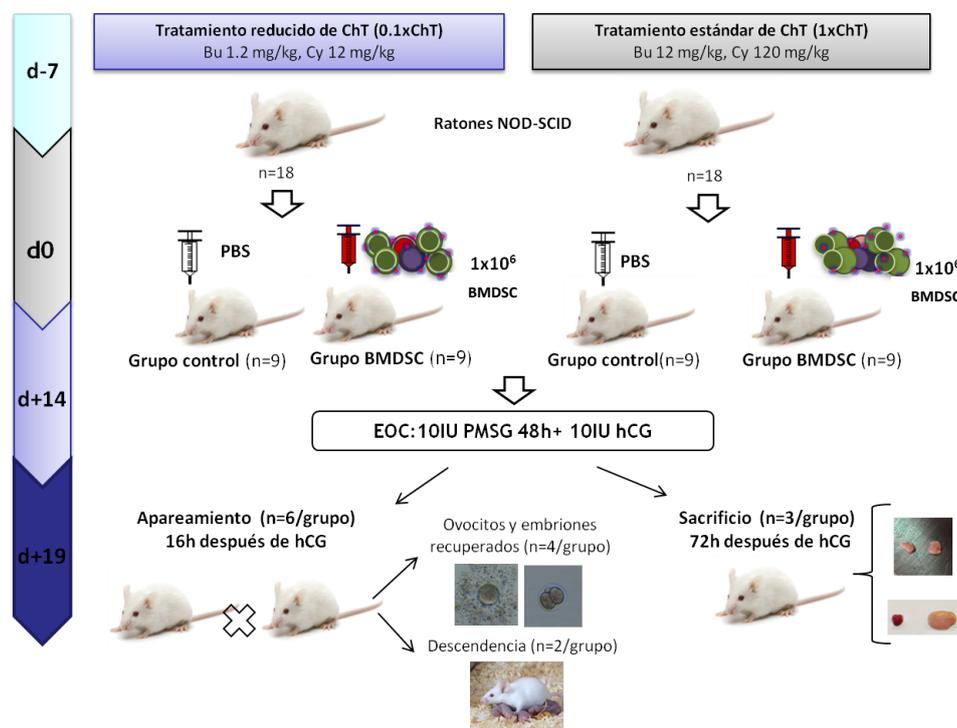


Figura 4. Esquema del diseño experimental de los efectos regenerativos de BMDSC en un modelo de ratón con daño ovárico inducido por quimioterapia

Abreviaturas: Bu, busulfan; Cy: ciclofosfamida; PBS, tampón fosfato salino; BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; EOC, estimulación ovárica controlada; PMSG, gonadotropina sérica de yegua preñada; hCG, gonadotropina coriónica humana; d, día.

3.2 Obtención de BMDSC

Se movilizaron las células madre de la médula ósea de 10 pacientes PR a sangre periférica mediante un tratamiento farmacológico con G-CSF durante 5 días. Una vez finalizado el tratamiento, dichas células se recuperaron mediante aféresis. A continuación, las células mononucleares se aislaron mediante protocolos estándar de centrifugación basados en Ficoll. En resumen, se diluyeron 4 mL de aféresis con PBS (Biowest) hasta un volumen final de 7 mL y se añadieron a 3 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Seguidamente, se realizó una centrifugación de 400 g durante 30 min a Temperatura Ambiente (TA). Después se recuperó cuidadosamente la interfase que contenía las BMDSC. Finalmente, estas células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Biowest) suplementado con albúmina sérica humana (Vitrolife) al 10% y 1X de penicilina/ estreptomicina (Invitrogen).

3.3 Marcaje celular

Las BMDSC se marcaron con Ion Molday Rhodamina B (MIRB, [2 mg Fe/mL], BioPAL, Worcester, MA) para su posterior localización. Este sistema de marcaje está basado en partículas paramagnéticas conjugadas al fluoróforo rodamina, permitiendo la visualización de las células tanto mediante tinción Prussian Blue (detección de depósitos de hierro) como mediante fluorescencia.

Para el marcaje, se incubaron 1×10^6 células con 50 $\mu\text{g/mL}$ de MIRB durante 18 horas, a 37°C, 5% CO_2 . A continuación, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS con calcio y magnesio (Biowest) para su posterior inyección. El marcaje con MIRB se evaluó en una alícuota de 100 μL usando un citómetro de flujo FC500 MCL (Beckman-Coulter, CA, EUA), midiendo la señal de la rodamina B a 575 nm.

3.4 Modelo animal

Tal y como se muestra en la Figura 4, se asignaron de forma aleatoria 36 ratones NOD-SCID hembra de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories, Francia) a los siguientes grupos experimentales: 0.1xChT-Control, 0.1x ChT- BMDSC, 1xChT- Control o 1xChT- BMDSC.

El grupo reducido 0.1xChT consistió en una dosis única de 1.2 mg/kg de Busulfan (Bu) y 12 mg/kg de Ciclofosfamida (Cy) (Sigma St. Louis MI), mientras que el grupo estándar 1xChT consistió en una dosis única de 12 mg/kg y 120 mg/kg.

El tratamiento quimioterapéutico se inyectó intraperitonealmente (ip) y una semana más tarde, en el día experimental 0 (d0), los animales asignados a los grupos control recibieron una inyección de 100 μ L de PBS en la vena de la cola usando una aguja de calibre 25, mientras que a los ratones de los grupos BMDSC se les inyectó 1×10^6 BMDSC-macadas y resuspendidas en 100 μ L de medio RPMI 1640 (Biowest).

En d14, los ratones se sometieron a una estimulación ovárica controlada consistente en la inyección ip de 10 IU de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) (Sigma St. Louis MI), y 10 IU de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Sigma St. Louis MI) a las 48h.

Seis animales de cada grupo se aparearon con machos fértiles 16 h después de la inyección de hCG. Cuatro de ellos se sacrificaron a las 48 h para evaluar la tasa de ovulación y fecundación, mientras que los otros dos se mantuvieron con el fin de obtener descendencia. El resto (tres por grupo) se sacrificaron 72 h después de la hCG para analizar los efectos del BMDSC sobre el ovario.

A lo largo de todo el experimento se monitorizó diariamente el peso corporal de cada uno de los ratones.

3.5 Monitorización del ciclo estral

El ciclo estral de los ratones se evaluó a lo largo del experimento realizando diariamente frotis vaginales. Para realizar cada uno de los frotis se empleó una jeringuilla con 100 μ L de suero fisiológico y sin penetrar en el orificio vaginal, se expulsó y recogió la mitad de dicho volumen un mínimo de 20 veces. Finalmente los 100 μ L se depositaron en un portaobjetos, y tras secarse, se realizó una tinción con violeta cristal al 1X (Sigma St. Louis MI) durante 1 min, realizando posteriormente dos lavados sucesivos de 1 min con agua miliQ.

Dichas muestras se evaluaron bajo microscopio óptico con el fin de determinar la fase del ciclo estral en la que se encontraba el ratón. Esta fase se estableció en función del tipo celular mayoritario y de la densidad celular de la muestra: Proestro, células epiteliales con núcleo abundantes; Estro: células epiteliales cornificadas en gran densidad; Metaestro: células epiteliales cornificadas en menor densidad y leucocitos abundantes; Diestro: baja densidad celular de leucocitos y aparecen células epiteliales con núcleo en baja densidad también.

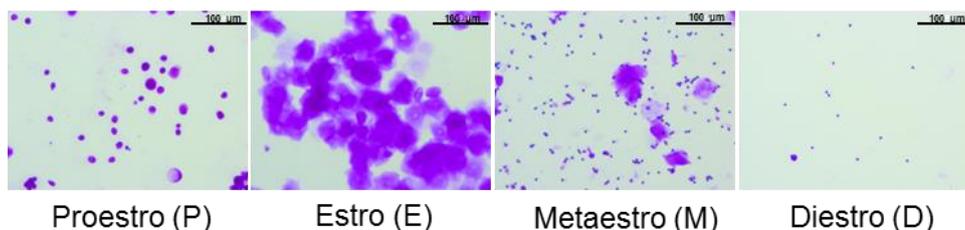


Figura 5. Representación de cada fase del ciclo estral. La barra negra representa una escala de 100 μm .

3.6 Recuperación de ovocitos y embriones del oviducto

Tras el sacrificio de aquellas ratonas que se habían cruzado con machos fértiles, se recuperaron los oviductos. Para ello, se cortó entre el ovario y útero, asegurándose de no perder parte del oviducto y de eliminar la grasa de la muestra para evitar posterior confusión de los embriones con gotas de grasa. Una vez extraídos, se colocaron en una placa Petri con medio FMH (Vitrolife). Para obtener los ovocitos y los embriones se hizo pasar medio a través del oviducto con ayuda de una aguja de calibre 30. Concretamente, se introdujo la aguja en el infundíbulo (situado al lado del ovario), y se hizo pasar el líquido hacia el extremo en contacto con el útero. De este modo, se evitó el daño en los ovocitos/embriones que podría darse debido a la válvula unidireccional situada en la interfaz útero-oviducto.

A continuación, con la ayuda de una lupa binocular, se aislaron y se clasificaron los ovocitos y embriones obtenidos, incubándose posteriormente en medio G-1 (Vitrolife) durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂.

3.7 Recuperación y procesamiento de los ovarios

Los ovarios de aquellas ratonas que no habían sido cruzadas se recuperaron tras el sacrificio y se fijaron en paraformaldehído (PFA).

Los ovarios sumergidos en PFA 4% se pasaron a una solución de etanol 70% 24 h después de su recogida. Una vez fijados, se incluyeron en parafina (Panreac), previa deshidratación mediante sucesivos pases por concentraciones crecientes de etanol y xilol (Merck), tal y como se muestra en la Tabla 1. Posteriormente, empleando un microtomo de rotación HM-340E (Microm), se realizaron cortes seriados de 4 μm que se adhirieron a portaobjetos SUPERFROST® PLUS (ThermoScientific).

Tabla 1. Pases realizados para la inclusión de las muestras en parafina

Reactivo	Tiempo (min)
Etanol 70%	60
Etanol 96%	60
Etanol 96% II	60
Etanol 100% I	60
Etanol 100% II	60
Etanol 100 % III	60
Xilol I	20
Xilol II	20
Xilol III	20
Parafina I	60
Parafina II	60

3.8 Localización de las células inyectadas en los ovarios

La presencia de las células inyectadas en los ovarios se evaluó mediante tinción Prussian blue (HT20; Sigma-Aldrich), tinción que permite la visualización de depósitos de hierro.

El procedimiento llevado a cabo consistió en desparafinar las muestras mediante 1 h a 60 °C y tres pases sucesivos por xilol (de 15 min cada uno), e hidratarlas mediante pases sucesivos por soluciones de etanol en concentraciones decrecientes (100%, 90%, 70%, 50% y H₂O destilada), cada uno de ellos de una duración mínima de 10 min. A continuación, las secciones de tejido se incubaron con una solución de ferrocianuro potásico y ácido clorhídrico (1:1) durante 10 min, realizándose posteriormente un lavado con agua desionizada. Seguidamente se realizó otra incubación con pararosanilina durante 3-5 min. Tras lavar con agua desionizada, las secciones se deshidrataron mediante pases sucesivos por concentraciones crecientes de etanol (70%, 96%, 100% y 100%) y por xilol (3 pases), y se montaron empleando el medio de montaje DePeX (BDH Prolabo). Finalmente, se analizaron y fotografiaron mediante un microscopio de campo claro Leica DMI 3000B.

3.9 Recuentos foliculares

Con el objetivo de realizar un recuento exacto del número de folículos primordiales/primarios/secundarios/terciarios/antrales/pre-ovulatorios, se tiñó con hematoxilina-eosina (H&E) el primero de cada 5 cortes seriados de 4 μm . Este criterio se estableció teniendo en cuenta que el tamaño de los folículos primordiales (los más pequeños dentro del ovario) en ratón es de aproximadamente 20 μm .

En primer lugar, estos cortes se desparafinaron y se hidrataron tal y como se ha especificado anteriormente. A continuación, se tiñeron con hematoxilina durante 5 min y posteriormente con eosina durante otros 5 min, lavando bien con agua corriente tras cada una de estas tinciones. Por último, los cortes se deshidratan y se montaron, tal y como se ha descrito previamente, para su posterior observación en un microscopio óptico.

Respecto al contaje, sólo se contaron los folículos morfológicamente normales con el núcleo del ovocito presente en la sección para evitar el doble conteo. Los folículos se clasificaron de la siguiente forma: Folículo primordial: ovocito rodeado por una capa de CG aplanadas; Folículo primario: ovocito rodeado por una capa completa de CG cuboidales; Folículo secundario: ovocito rodeado por dos capas, o más, de CG cuboidales; Grandes folículos preantrales: más de tres capas de CG; Folículos antrales: con cavidad del antro y Folículos preovulatorios: con un mayor tamaño, un gran antro y el ovocito aparece en una esquina rodeado por las células del cúmulo.

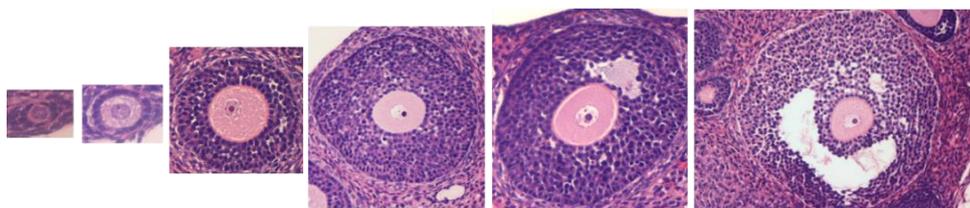


Figura 6. Ovocitos en las diferentes fases del desarrollo folicular. De izquierda a derecha: folículo primordial, secundario, terciario, preantral, antral y preovulatorio.

3.10 Proliferación celular

Para determinar el estado del nicho ovárico, se analizaron y cuantificaron las células del estroma y folículos en proliferación mediante una inmunohistoquímica frente a Ki67. Ki67 es una proteína nuclear asociada y necesaria para la proliferación celular. Se expresa durante

todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero no en las células en reposo (G0).

En primer lugar, los cortes de ovario se desparafinaron e hidrataron tal y como se detalla en el apartado 3.8. Tras ello, y a fin de exponer los grupos enmascarados por el PFA, las muestras se introdujeron en una solución de 10 mM de citrato de sodio pH 6 (Dako) en un microclave (J.P Selecta) a una presión de 1.5 Bar durante 3 min. Una vez atemperadas, éstas se sumergieron durante 15 min en una solución de Metanol: H₂O₂ (29:1) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. A continuación, para reducir el marcaje inespecífico, las muestras se incubaron durante 1 h en una solución con un 10% de suero de caballo. Tras este bloqueo, se incubaron con el anticuerpo primario anti-Ki67 (Abcam) a una dilución 1:500 durante 18 h a 4 °C. Seguidamente, se realizaron tres lavados con TBST (Dako) y se incubaron a TA durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-rabbit biotilado (Vector Laboratories). Ambos anticuerpo (primario y secundario) se diluyeron en una solución con un 1% de suero de caballo. Después, las muestras se lavaron tres veces con TBST y se incubaron durante 30 min a TA con el complejo avidina-biotina peroxidasa con el fin de amplificar la señal (ABC, Vectastain Elite, Vector Laboratories). Para el revelado de la reacción se utilizó un kit de diaminobencimida como sustrato cromogénico para la peroxidasa (DAB, Vector Laboratories), siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción química se paró con agua visualizando las preparaciones en un microscopio óptico para determinar el tiempo adecuado de revelado. Para poder contrastar la señal se realizó, a continuación, una tinción suave con hematoxilina y los cortes se deshidrataron mediante pases por etanol y xilol. Finalmente, las muestras se montaron empleando el medio de montaje DePeX (BDH Prolabo) y se analizaron y fotografiaron mediante un microscopio de campo claro Leica DMI 3000B. En todas las inmunohistoquímicas realizadas se incluyó un control negativo del marcaje, el cual no se incubó con el anticuerpo primario.

3.11 Apoptosis

La fragmentación del DNA se detectó y cuantificó mediante el ensayo TUNEL (del inglés Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling). Este ensayo aprovecha las roturas en el ADN de las células apoptóticas que pueden ser identificadas mediante el enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT), un enzima que cataliza la adición de dUTPs marcados a los extremos 3' generados como consecuencia de la fragmentación del ADN.

Concretamente, se empleó el kit In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche). Resumiendo, tras desparafinar, hidratar y realizar el desenmascaramiento antigénico tal y

como se ha indicado en apartados anteriores, los cortes se incubaron con el mix de TUNEL durante 60 min a 37°C en oscuridad y en cámara húmeda. Este mix consiste en una mezcla de dos soluciones: solución de marcaje, que contiene TMR-dUTP; y solución enzimática, con el enzima TdT. Durante la incubación la TdT añade moléculas de TMR-dUTP a los extremos 3' generados como consecuencia de la fragmentación del ADN. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados con PBS, y se montaron las muestras con el medio de montaje ProLong Gold antifadereagent con DAPI (Life technologies), y se dejaron 18 h a TA. La detección del marcaje se realizó mediante un microscopio de fluorescencia Leica EL6000, excitando a 540 nm y detectando a 580 nm.

Se incluyó un control positivo y un control negativo del marcaje. Como control positivo se utilizó una sección que, tras el desenmascaramiento antigénico, se incubó durante 10 min con 2000 U/mL de DNAsa I (en 50mM Tris + 1mg/mL de BSA, pH 7.5). Como control negativo se empleó una sección que se incubó únicamente con la solución de marcaje (sin la solución enzimática).

Para cuantificar la muerte celular, se analizaron tres secciones de cada muestra con señal TUNEL. Se obtuvieron 4 imágenes a 20X de cada sección, y se cuantificaron las células apoptóticas mediante Image Pro-Plus, midiendo el área de las zonas marcadas como apoptóticas respecto al área total.

3.12 Densidad microvascular (MVD)

El análisis de la vascularización se realizó combinando una inmunofluorescencia frente a alpha-smooth muscle actine (α -sma) con el empleo de la isolectina B4 (IB4) conjugada a fluoresceína (Vector Laboratories).

α -sma es una actina citoplasmática presente en la pared de los vasos maduros y en la lámina muscular y en la lámina propia de la mucosa intestinal. Por su parte, la IB4 (aislada de *Griffonia Simplicifolia*) se utiliza ampliamente como marcador de células endoteliales de ratón, rata, cabra y conejo al unirse específicamente a una glicoproteína presente en la membrana de estas células en dichas especies y en otras especies no-primates.

Brevemente, los cortes se desparafinaron y se hidrataron tal y como se ha detallado anteriormente. A continuación, se realizó el desenmascaramiento antigénico empleando una solución de 10 mM de citrato de sodio pH 9 (Dako) en un microclave (J.P Selecta) a una presión de 1.5 Bar durante 3 min. Una vez atemperadas, las secciones se incubaron durante 30 min a TA con una solución con 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 0.05% Tween a pH 7.4. Seguidamente, las secciones se incubaron 10 min a TA con una solución de 1% BSA y

otros 20 min a TA con la solución de 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 0.05% Tween a pH 7,4. A continuación, se incubaron las secciones con la IB4 (conjugada a fluoresceína) a una dilución 1:50, 18 h a 4°C. Por último, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti α -sma a la dilución 1:200 conjugado a Alexa 594 (Sigma) durante 30 min a TA, se montaron con medio de montaje con DAPI (Life Technologies) y se analizaron y fotografiaron mediante un microscopio de fluorescencia Leica EL6000.

Se estudiaron cuatro cortes representativos de cada muestra, y al igual que en el caso de la proliferación y apoptosis, se obtuvieron 4 imágenes al 20X de cada una de las secciones empleando un microscopio de fluorescencia (LEICA DM4000B) y una cámara digital conectada (LEICA DFC450C, Leica Microsystems GmbH, Alemania). Una vez obtenidas las imágenes, se analizaron con el software Image Pro-plus (Mediacybernetics, Carlsbad, CA). Las zonas de la imagen que aparecían positivas para la isolectina fueron consideradas como vasos, expresándose la MVD como área de los vasos (área IB4+) por área de tejido.

3.13 Evaluación de la descendencia

Las ratonas, que tras cruzarse con machos fértiles no fueron sacrificadas, se mantuvieron durante el periodo de gestación con el fin de observar si eran capaces de obtener una descendencia con crías vivas y sanas.

Se observaron que hembras quedaron gestantes, y se contó el número de crías en el día del nacimiento.

3.14 Estadística

Todos los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Se realizó el test de Kruskal-Wallis y comparaciones dos a dos con el grupo control usando el test U de Mann-Whitney, para evaluar los resultados entre los grupos.

Para la elección del test estadístico a emplear, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. En los casos donde la distribución de los datos es normal, se aplicó el t-test Kruskal-Wallis. En caso de que no haya una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico Mann-Whitney.

Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron utilizando SPSS 19.0 (IBM, Somers, NY, EE.UU.).

4. RESULTADOS

4.1 Peso de los ratones tras el tratamiento con quimioterapia y monitorización del ciclo estral.

Como se puede observar en la Figura 7, la administración de 0.1xChT provocó una disminución en el primer día de $5.7 \pm 2.4\%$ en el peso corporal de los ratones mientras que la 1xChT produjo una reducción mayor, de $13.1 \pm 1.3\%$. Dicho efecto pudo apreciarse especialmente en los primeros días, aunque en el grupo que recibió la dosis estándar de quimioterapia se mantuvo durante la primera semana del experimento.

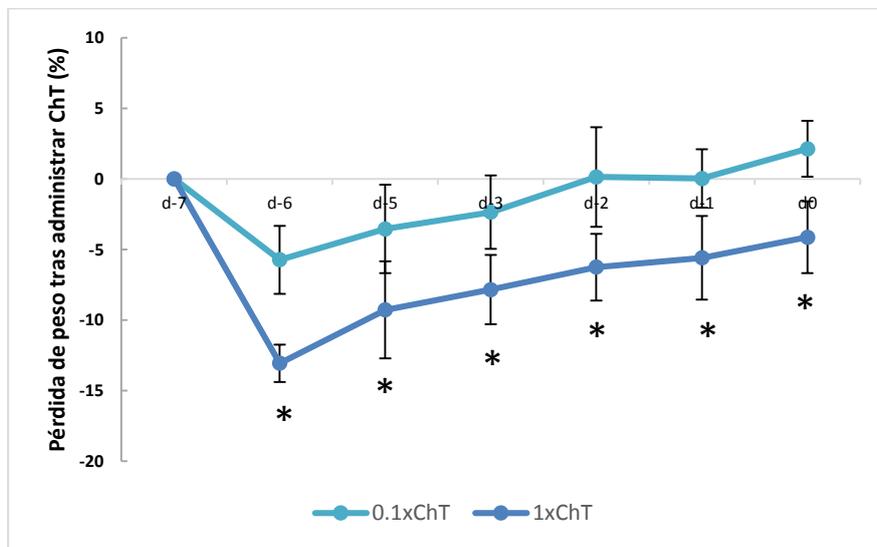


Figura 7. Pérdida de peso corporal de los ratones tras administrar ambas dosis de quimioterapia.

Abreviaturas: d, día; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; *, estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Con respecto a sus efectos sobre el ciclo estral, como se muestra en la Figura 8, la administración de quimioterapia afectó en todos los casos a la ciclicidad. Sin embargo, tras la infusión de BMDSC, el 75% de los ratones recuperó un ciclo regular en ambas dosis de quimioterapia, entrando en las fases de proestro y estro, lo que indica una recuperación de la secreción de estradiol. Por el contrario, ninguno de los ratones de los grupos control volvió a ciclar con normalidad, quedando estancado el ciclo estral en fases leucocitarias (metaestro y diestro).

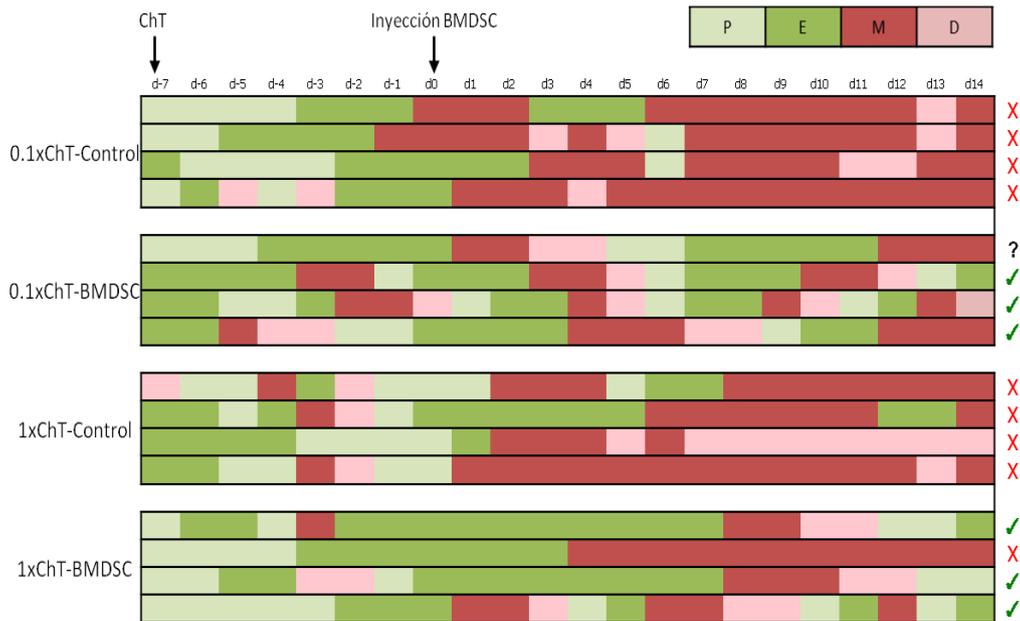


Figura 8. Monitorización del ciclo estral de los ratones tras la quimioterapia y tratamiento con BMDSC. Las flechas negras indican el día de administración. Los ticks verdes indican recuperación regular del ciclo, las cruces rojas ciclo dañado y los interrogantes no determinados

Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; ChT, quimioterapia; d, día; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; P, proestro; E, estro; M, metaestro; D, diestro.

4.2 Peso corporal y ovárico al final del experimento.

Al final del experimento, se comparó el peso corporal entre los grupos control y BMDSC para cada dosis de quimioterapia y no se detectaron diferencias (Figura 9A). Sin embargo, el peso ovárico aumentó significativamente en los ratones que recibieron la inyección de BMDSC en comparación con los controles en ambas dosis de quimioterapia (0.1xChT-Control: 18.8 ± 2.0 mg frente a 0.1xChT-BMDSC: 25.2 ± 2.2 mg, $p=0.043$ y 1xChT-Control: 9.0 ± 3.3 mg frente a 1xChT-BMDSC: 16.9 ± 2.9 mg, $p=0.043$), tal y como se observa en la Figura 9B.

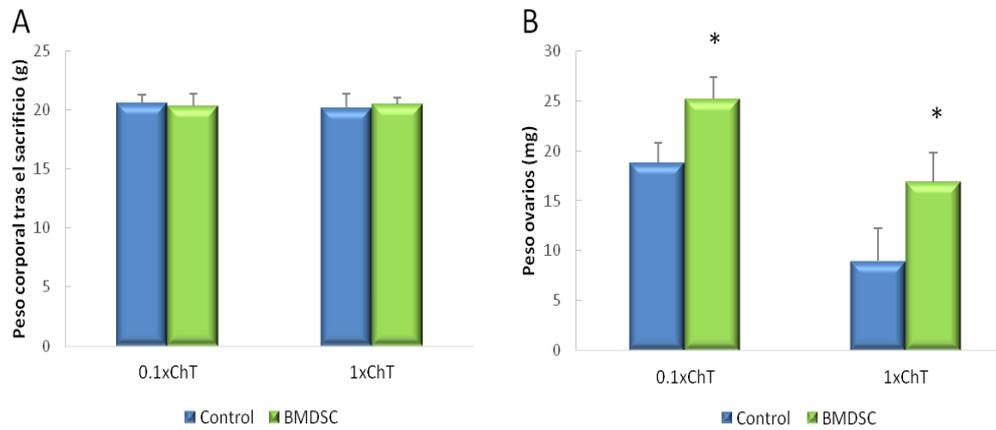


Figura 9. Peso corporal y ovárico. Análisis del peso corporal (A) y de los ovarios (B) tras el sacrificio en ratones tratados con BMDSC y ratones control en ambas dosis de quimioterapia
Abreviaturas: BMDSC; células madre derivadas de la médula ósea; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; *, estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

El efecto también puede ser observado en las secciones histológicas de los ovarios, donde se observa a simple vista el menor tamaño de aquellos ovarios que no recibieron tratamiento con BMDSC (0.1xChT y 1xChT Control), especialmente en los de 1xChT (Figura 10), frente a los que sí lo recibieron.

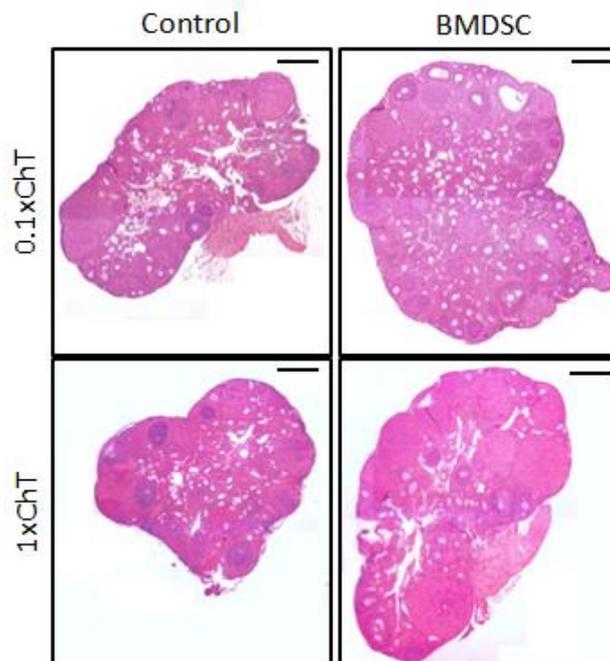


Figura 10. Secciones de ovario de cada grupo experimental. Visualización mediante tinción con H&E. La barra negra muestra una escala de 500 μm.
Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; H&E, hematoxilina y eosina.

4.3 Localización de las BMDSC

Las células BMDSC inyectadas se detectaron en los ovarios de los ratones aprovechando su previo marcaje con MIRB y utilizando una tinción Prussian Blue. Dichas células se localizaron principalmente dentro de las células teca de los folículos del ratón y cerca de los vasos, como se muestra en la Figura 11. Sin embargo, en ningún caso se observa marcaje azul con esta función en los ovarios de los ratones de los grupos control.

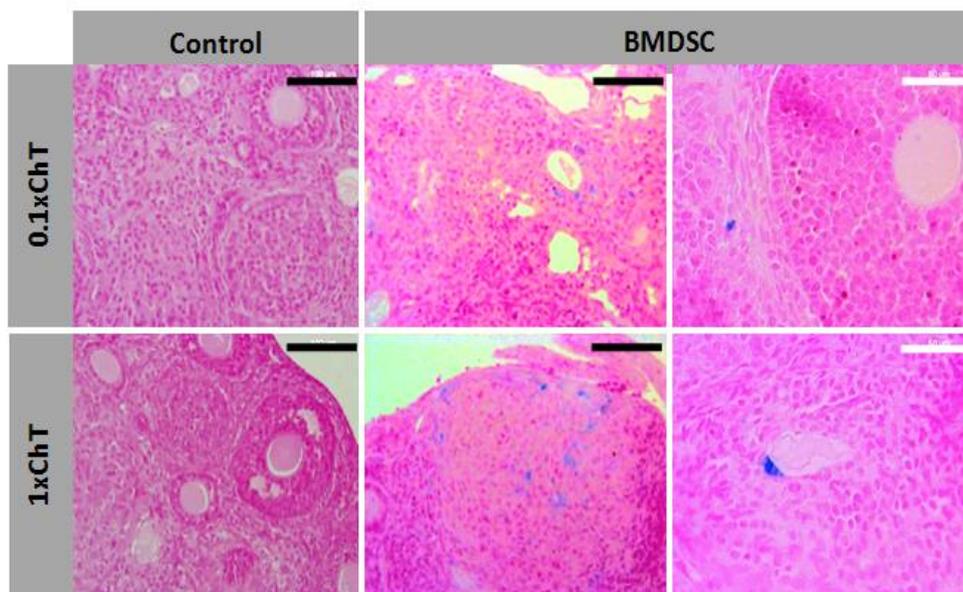


Figura 11. Tinción Prussian Blue en secciones de ovario. Las células BMDSC, marcadas con MIRB, aparecen teñidas de color azul. La barra negra muestra una escala de 100 μm y la barra blanca una escala de 50 μm .

Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; MIRB, ion molday rhodamina B.

4.4 Efecto de la inyección celular en el desarrollo folicular

Para analizar los efectos de la infusión celular en las poblaciones foliculares, se obtuvieron muestras ováricas de ratones después de EOC con 10 IU de PMSG y 10 IU hCG a las 48h.

Al comparar el número total de folículos (0.1xChT-Control: 527.6 ± 34.4 , 0.1xChT-BMDSC: 348 ± 144.3 , 1xChT-Control: 436.6 ± 336.3 y 1xChT-BMDSC: 276.6 ± 31.8) así como las subpoblaciones de folículos quiescentes y preantrales pequeños, no se detectaron diferencias entre los controles y los animales tratados con BMDSC. Sin embargo, si se observaron

diferencias en los folículos antrales, preovulatorios y cuerpos lúteos, tal y como se representa en la Figura 12.

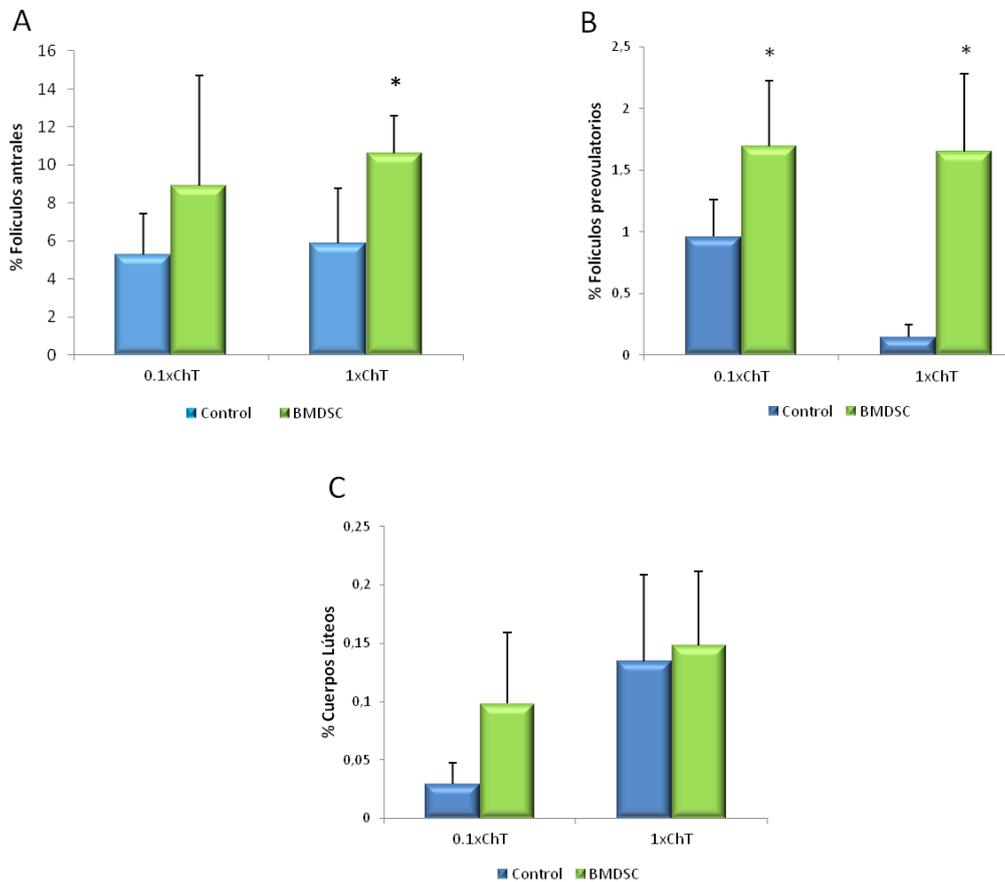


Figura 12. Recuento folicular en muestras de ovario tras BMDSC en comparación con los grupos control tras EOC. A) Porcentaje de folículos antrales. B) Porcentaje de folículos preovulatorios. C) Porcentaje de cuerpos lúteos.

Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; *, estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Concretamente, en la dosis 0.1xChT, el trasplante de BMDSC aumentó los folículos antrales (0.1xChT-Control: $5.2 \pm 1.9\%$ frente a 0.1xChT-BMDSC: $8.9 \pm 5.2\%$, $p = \text{NS}$, Figura 12A), así como el porcentaje de folículos preovulatorios, siendo solo el aumento en los folículos preovulatorios estadísticamente significativo (0.1xChT-Control: $0.959 \pm 0.298\%$ frente a 1xChT - BMDSC: $1.690 \pm 0.5335\%$, $p = 0.04$, Figura 12B). Ambos parámetros también se mejoraron tras la inyección de BMDSC en los ratones tratados con 1xChT (folículos antrales: 1xChT-Control: $5.9 \pm 2.6\%$ frente a 1xChT-BMDSC: $10.6 \pm 1.8\%$, $p = 0.01$; folículos preovulatorios: 1xChT-Control: $0.1496 \pm 0.095\%$ frente a 1xChT-BMDSC: $1.647 \pm 0.63496\%$, $p = 0.004$).

Además, cuando se comparó el porcentaje de CL formados tras 72 horas desde la administración de hCG se detectó un mayor número en los grupos tratados respecto a los grupos control, aunque en ninguno de los casos fue estadísticamente significativo como se observa en la Figura 12C.

4.5 Efecto del tratamiento con BMDSC sobre la fertilidad

Para evaluar los efectos de la administración de BMDSC sobre la maduración ovocitaria, la ovulación y el desarrollo embrionario, animales de todos los grupos experimentales se aparearon con machos fértiles después de EOC (Figura 1).

En la 1xChT, la infusión de BMDSC aumentó el número total de ovocitos metafase II (MII) recuperados del oviducto (Figura 13A). La cantidad de embriones obtenidos (Figura 13B y 13C), así como la tasa de fecundación ($p < 0.05$) y la viabilidad del embrión en día 3 también aumentaron después de la administración de BMDSC como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Ovocitos MII y embriones recuperados del oviducto tras la EOC y el cruce con machos fértiles.

Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; EOC, estimulación ovárica controlada; d, día; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; MII, metafase II; n, número; *, estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Grupo experimental	MII ovulados(n)	Embriones 2-células (n)	Tasa fecundación (E/MII)	Número de embriones d3
0.1xChT-Control	2.5±2.5 (10)	2.0±2.8 (8)	50±57.7	8
0.1xChT-BMDSC	7.2±6.9 (30)*	2.7±3.8 (11)	31.5±29.0	11
1xChT-Control	4.7±3.2 (14)	0.7±1.1 (2)	33.3±33.3	2
1xChT-BMDSC	4.7±1.3 (19)	2.2±1.0 (9)	56.7±8.2 *	9

En los animales tratados con 0.1xChT, la inyección de BMDSC fue capaz de triplicar el número total de ovocitos recuperados en MII ($p < 0.05$). Sin embargo, y aunque los valores fueron mejorados, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el número o viabilidad de los embriones obtenidos (Figura 13B).

Como puede observarse en la Figura 13C, los embriones del grupo control en ambas dosis de quimioterapia, mostraron una mayor fragmentación y peor morfología que los tratados con infusión de BMDSC.

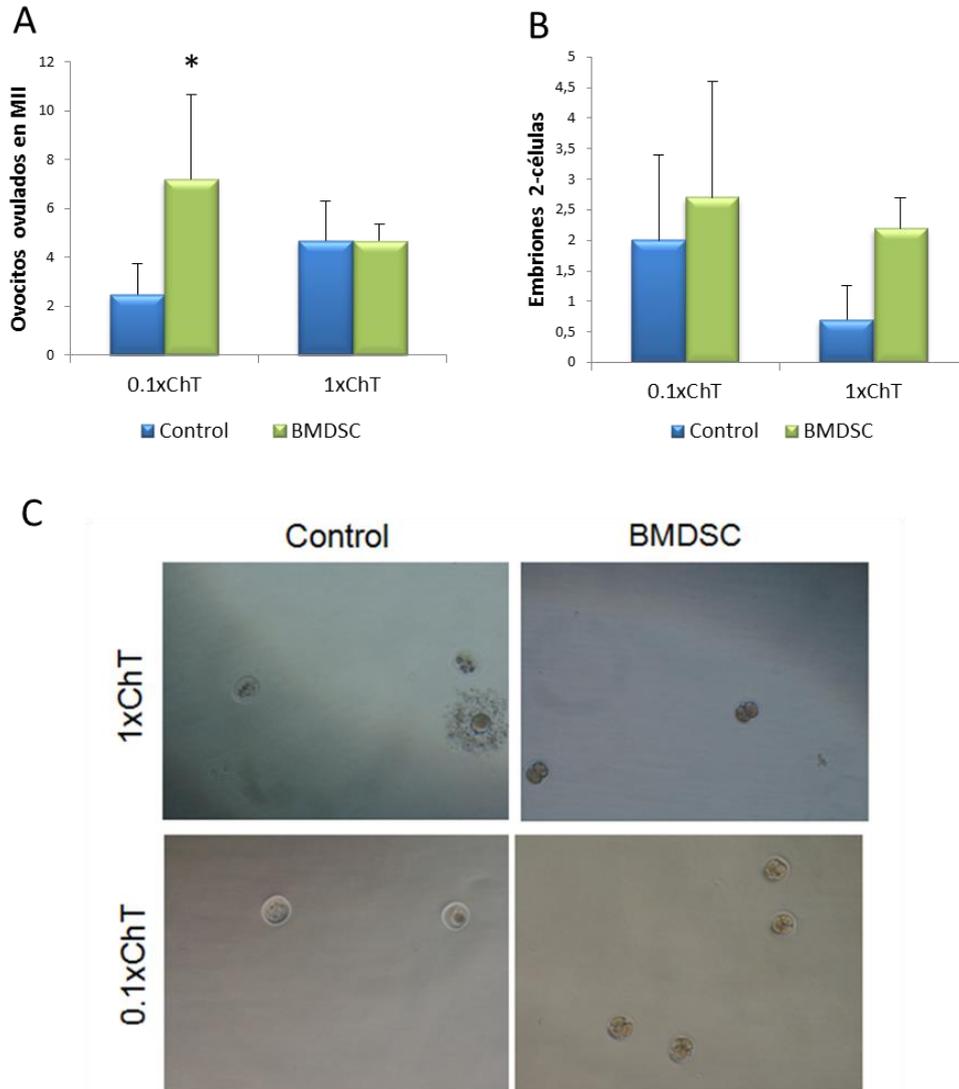


Figura 13. Resultados de fertilidad. A) Número de ovocitos MII viables recuperados de los oviductos, 16 horas después de la administración de hCG, de los grupos BMDSC en comparación con los grupos control. B) Número total de embriones de 2-células obtenidos en los grupos BMDSC en comparación con los grupos controles. C) Microfotografías de ovocitos MII y embriones de 2-células recuperados del oviducto.

Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; hCG, gonadotropina coriónica humana; MII, metafase II; *, estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

4.6 Vascularización

La vascularización en los ovarios de ratón se evaluó mediante doble inmunofluorescencia con IB4 y α -SMA.

En el caso de la dosis 0.1xChT, se observó una ligera subida de la MVD aunque ésta no fue significativa, (0.1xChT-Control: $2.7 \pm 1.2\%$ frente a 0.1xChT-BMDSC: $3.4 \pm 0.3\%$, $p=NS$) mientras que el grupo que recibió la dosis 1xChT, el tratamiento con BMDSC aumentó el área vascularizada de $1.8 \pm 0.9\%$ en el grupo control a $5.1 \pm 0.8\%$ en el inyectado ($p=0.012$), tal y como se observa en la Figura 14.

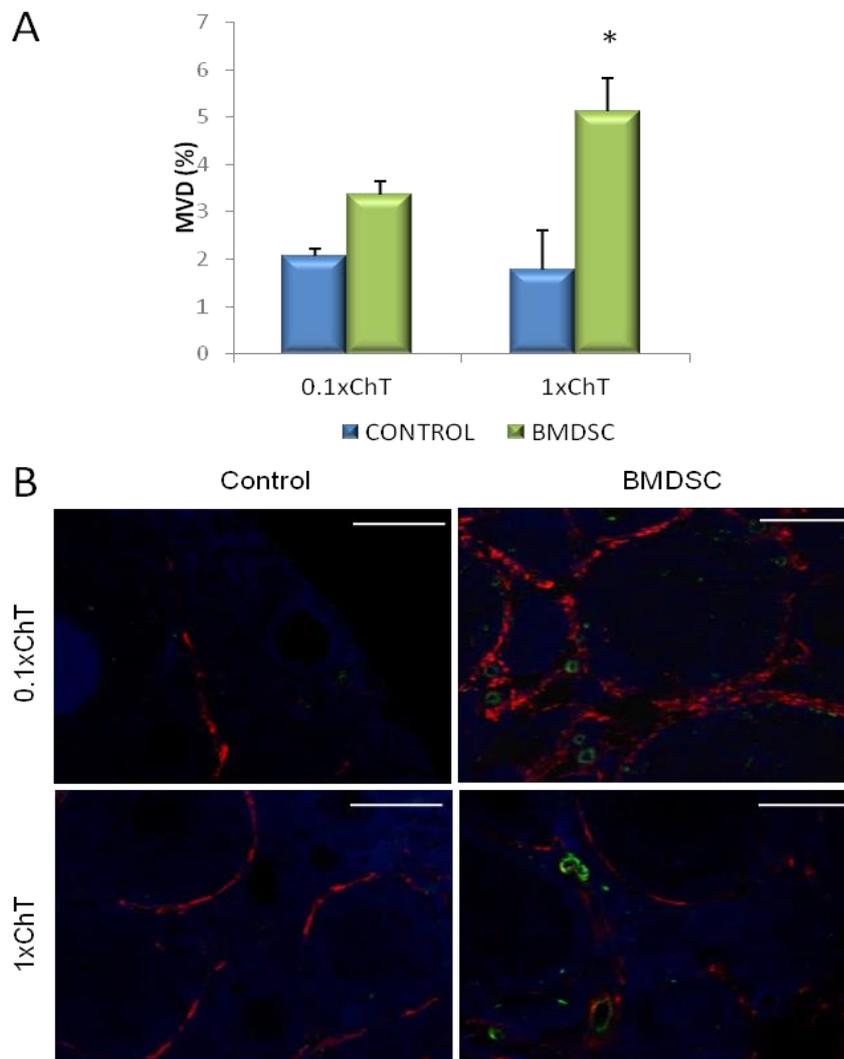


Figura 14. Evaluación de la vascularización. A) MVD en los grupos tratados con BMDSC y los grupos control. B) Inmunofluorescencia de microvasos. En verde aparecen las zonas marcadas con IB4, y en rojo pueden observarse las marcadas con α -SMA. La barra blanca muestra una escala de $100 \mu\text{m}$.

Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; α -smooth muscle actine (α -SMA); IB4, isolectina B4; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; MVD, densidad de microvasos; *, estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

4.7 Proliferación celular y apoptosis

Para evaluar la presencia de células proliferativas en los folículos y el estroma, se llevó a cabo una inmunotinción frente a Ki 67.

En ambas dosis de quimioterapia, la proliferación celular mejoró significativamente en los ovarios de los ratones que recibieron BMDSC en comparación a los controles (0.1xChT-Control: $0.7 \pm 0.2\%$ frente a 0.1xChT-BMDSC: $1.5 \pm 0.4\%$, $p < 0.05$ y 1xChT-Control: $1.0 \pm 0.3\%$ frente a 1xChT-BMDSC: $2.3 \pm 0.5\%$, $p < 0.05\%$), tal y como se muestra en la Figura 15A.

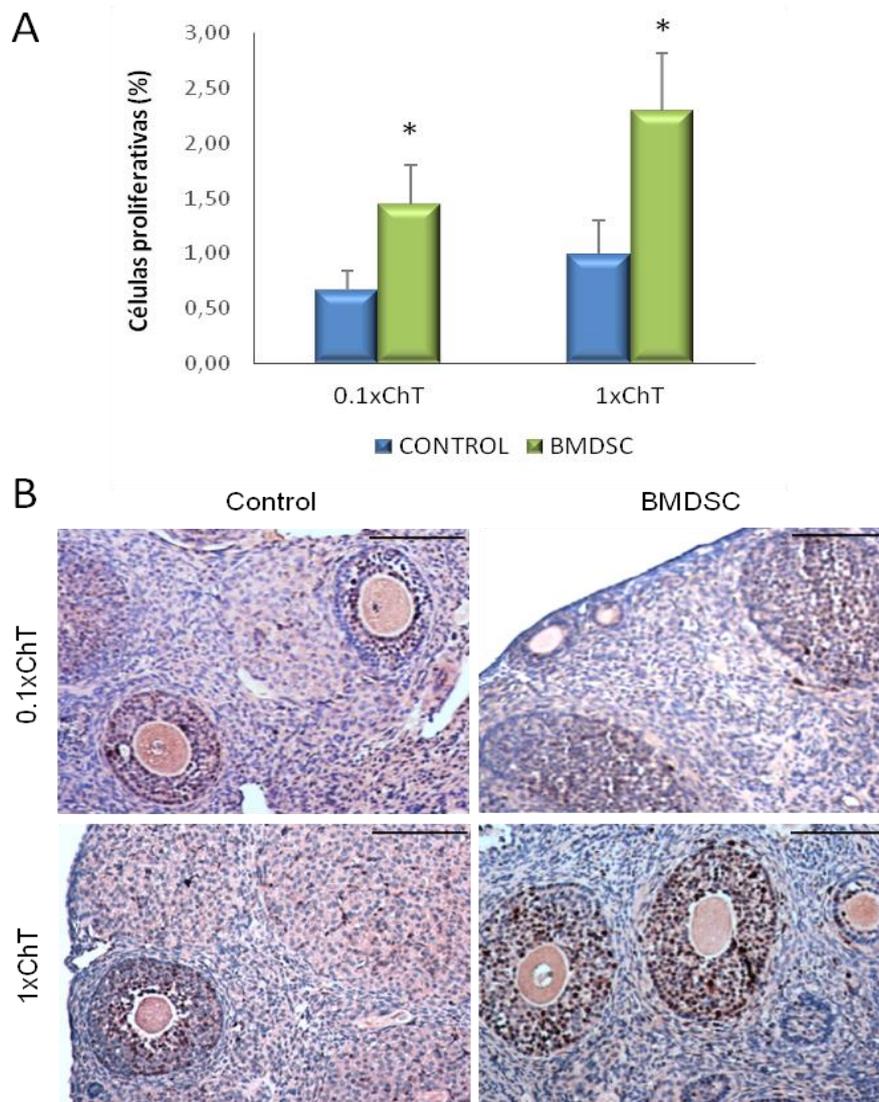


Figura 15. Evaluación de la proliferación celular. A) Porcentaje de células proliferativas en los grupos tratados con BMDSC y control en ambas dosis de quimioterapia. B) Secciones de ovario. En marrón se observan las células en proliferación y en azul mediante tinción H&E el resto de tejido. La barra negra muestra una escala de 100 µm

Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; H&E, hematoxilina y eosina; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; *, estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Las células en proliferación detectadas fueron principalmente células de la granulosa y células foliculares (Figura 15B).

El ensayo TUNEL se realizó para estudiar el número de células apoptóticas en el estroma ovárico. La cantidad de células apoptóticas (Figura 16A) se redujo drásticamente en el tratamiento con la dosis 1xChT de $5.1 \pm 4.4\%$ en el control a $0.5 \pm 0.2\%$ después de la inyección de BMDSC ($p < 0.05$), mientras que en la dosis 0.1xChT esta reducción varió de $5.9 \pm 4.5\%$ en control a $0.5 \pm 0.3\%$ en el grupo tratado.

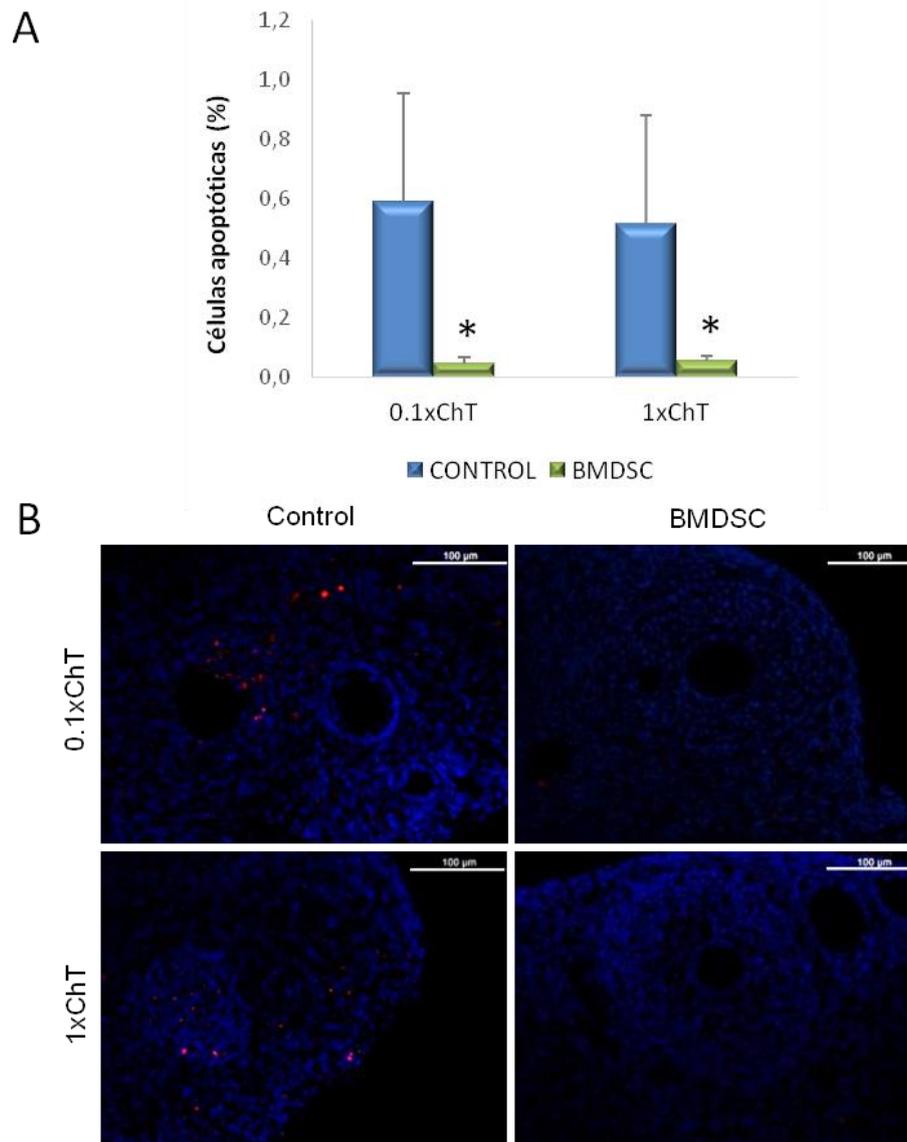


Figura 16. Ensayo TUNEL. A) Porcentaje de células apoptóticas en los grupos tratados con BMDSC y los grupos controles, en ambas dosis de quimioterapia. B) Imagen de fluorescencia donde se observan en rojo las células apoptóticas y en DAPI (azul) todas las células presentes. La barra blanca muestra una escala de $100 \mu\text{m}$
Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia *, estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

4.8 Efecto del tratamiento con BMDSC sobre la descendencia

Tras la EOC y el cruce con machos fértiles, se mantuvieron parte de las ratonas para evaluar la descendencia de cada uno de los grupos estudiados.

Tal y como puede observarse en la Tabla 3, el 50 % de las hembras de cada grupo quedaron preñadas, excepto en el grupo control tratado con la dosis 1xChT que ninguna de las ratonas gestó. Además, si se compara el grupo tratado con BMDSC respecto al control cuando se administró la dosis 0.1xChT, se observa una tendencia a un mayor número de crías. En el caso del tratamiento con 1xChT, solo se obtuvieron crías en las ratonas que habían recibido inyección de BMDSC.

Tabla 3. Número de embarazos y crías de ratón obtenidas.

Abreviaturas: BMDSC, células madre derivadas de la médula ósea; 0.1xChT, dosis reducida de quimioterapia; 1xChT, dosis estándar de quimioterapia; n, número.

Grupos	Ratonas (n)	Embarazos	Número crías
1xChT- Control	2	0 (0%)	0
1xChT- BMDSC	2	1 (50%)	9
0.1xChT- Control	2	1 (50%)	7
0.1xChT- BMDSC	2	1 (50%)	13

Las crías nacidas presentaban una morfología y aspecto normal, tal y como se observa en la Figura 17.



Figura 17. Fotografía de las crías de ratón en el primer día tras su nacimiento. Barra de escala 1 cm.

5. DISCUSIÓN

Este estudio evalúa por primera vez los efectos regenerativos de las BMDSC humanas sobre el nicho ovárico y el crecimiento folicular en situaciones clínicas como POI y PR, generadas en ratón mediante quimioterapia.

En términos generales, las BMDSC fueron capaces de alcanzar el nicho ovárico, donde se establecieron principalmente cerca de vasos y folículos. Allí promovieron el crecimiento folicular a estadio pre-ovulatorio, aumentaron la vascularización y proliferación celular e inhibieron la apoptosis en los ovarios de ratón dañados con quimioterapia. Además, la infusión de BMDSC fue capaz de restaurar el ciclo estral, previamente interrumpido a consecuencia de los tratamientos de quimioterapia. También se mejoró la capacidad de ovulación en las dos dosis de quimioterapia estudiadas, tanto en la que imitaban a las pacientes POI como a las PR, aumentando el número de ovocitos MII y embriones recuperados del oviducto tras la EOC.

El uso de agentes gonadotóxicos ha sido ampliamente utilizado en varios estudios en animales incluyendo aquellos que evalúan los efectos de las células madre en las células gonadales, somáticas y germinales (Johnson et al., 2005; Eggen et al., 2006; Lee et al., 2007; Abd-Allah et al., 2013; Lai et al., 2013; Skaznik-Wikiel et al., 2013; Sun et al., 2013). En estos estudios se empleaban dosis elevadas de quimioterapia con el objetivo de simular los tratamientos quimioterapéuticos empleados en pacientes con cáncer. Dichas dosis, producen un gran daño en los ovarios, representando una de las peores situaciones clínicas (POI). De hecho, esta dosis estándar ha sido descrita como la más alta capaz de inducir infertilidad no reversible (Batchvarov et al., 2016), al tiempo que permite la supervivencia animal (Generoso et al., 1971).

En este estudio, además de simular y analizar la situación de peor pronóstico (POI), se han evaluado otras condiciones ováricas no severas como el envejecimiento y la PR, muy frecuentes en la actualidad, y que podrían representar un objetivo adecuado para la aplicación de esta posible terapia regenerativa. Con este propósito, se diseñó un modelo de daño ovárico leve mediante una dosis reducida de quimioterapia. En estas condiciones, la dotación folicular existente presenta problemas para crecer y ser ovulada sin llegar a una pérdida total de función ovárica como en POI.

Tanto la dosis estándar de quimioterapia como la reducida produjeron una alteración del ciclo estral. Sin embargo, el 75% de los animales tratados con BMDSC recuperó la ciclicidad regular tanto en el de modelo de POI como en el de PR. Concretamente, en estos ratones, tras los efectos de la quimioterapia se volvió a detectar fase de proestro seguida de estro, lo que indicaría la existencia de un pico de estradiol (Allen, 1922) y, por tanto, una restauración de la función ovárica y la secreción hormonal. Por el contrario, en ninguno de los ratones del grupo control se detectó un restablecimiento de la ciclicidad, quedando el ciclo estancado en fases

leucocitarias (diestro y metaestro). Este hecho tendría una explicación lógica pues, tal y como se ha reportado en estudios anteriores (Nelson et al., 1981), cuando los ratones envejecen se prolonga el periodo de diestro y disminuyen los niveles de estradiol en plasma.

En cuanto al desarrollo folicular, en el caso de la dosis 1xChT, la administración de BMDSC duplicó la formación del antro y aumentó de forma muy significativa (x11) el desarrollo de folículos a estadio preovulatorios, con respecto al grupo control. Este mismo efecto sobre el desarrollo folicular se observó también en el caso de la dosis 0.1xChT, donde la administración de BMDSC duplicó la formación de folículos antrales y la de preovulatorios. En el modelo de PR, el aumento de folículos preovulatorios fue menor que en el caso de la dosis estándar de quimioterapia debido probablemente al menor daño inducido en el ovario. Por tanto, en ambas situaciones, el hecho de administrar BMDSC permitió rescatar los folículos quiescentes presentes en el ovario dañado tras la administración de quimioterapia, y permitir que se desarrollaran desde el estado primordial hasta el estado preovulatorio.

Otro de los resultados analizados fue la vascularización de los ovarios, debido a la importancia de ésta en el desarrollo folicular. Cuando los ratones fueron tratados con BMDSC, la densidad de microvasos aumentó un 185% en la condición de daño ovárico severo, y un 68% en la condición menos gonadotóxica. Por tanto, se puede deducir que las BMDSC una vez establecidas en el nicho ovárico, son capaces de contribuir a la formación de nuevos vasos, lo que es fundamental para que los folículos reciban los nutrientes necesarios para poder comenzar su crecimiento (Fraser, 2006). Los nuevos vasos formados estarían contribuyendo a la formación del antro y de CL (Tamanini y De Ambrogi, 2004), lo que podría explicar el mayor número de folículos antrales, preovulatorios y CL obtenidos cuando se administran las BMDSC. Estos resultados están apoyados por estudios como el de Mauro et al. (2014), donde se pone de manifiesto que el crecimiento folicular y el éxito de la ovulación se debe, en parte, a la red de vasos sanguíneos necesarios para las funciones proliferativas y endocrinas de los folículos. Además, existen ensayos en humanos que muestran como el flujo sanguíneo de los ovarios está alterado en mujeres de edad avanzada y PR (Pan et al., 2004) de manera que, las BMDSC serían una buena herramienta para mejorar la angiogénesis y en consecuencia, los resultados reproductivos.

Por otro lado, la inyección de BMDSC mejoró la viabilidad del estroma al favorecer la proliferación celular y reducir la apoptosis, principal efecto de la quimioterapia en las células del ovario que se encuentran en división. Dicho resultado concuerda con los obtenidos en otros estudios con otros tipos de células madre. Este es el caso publicado por Sun et al. (2013) donde muestran que tras trasplantar células madre adiposas en ovarios de ratón dañados con

quimioterapia, el número de células en apoptosis disminuye. Por tanto, se apoya la idea de que regenerando el nicho ovárico dañado, éste pueda de nuevo promover y mantener la activación y el crecimiento folicular recuperando su capacidad natural de ovulación.

Sin embargo, uno de los resultados más relevantes obtenidos en el presente estudio es el aumento del número total de ovocitos en MII inducido tras infusión de BMDSC. Dicho efecto pudo observarse en el modelo de ratones POI, donde el estado reproductivo se deterioró gravemente, y en la condición de envejecimiento y PR. Además, el tratamiento con BMDSC fue capaz de recuperar los ovocitos no-dañados residuales incluso en la situación altamente gonadotóxica inducida por la dosis alta de quimioterapia, permitiendo la recuperación de 9 embriones en total después del apareamiento, frente al total de 2 embriones obtenidos de las 4 hembras control. Por otro lado, en la dosis reducida, aunque la cantidad de embriones recuperados no se vio muy afectada, al ser esta dosis significativamente menos gonadotóxica que la estándar, el número de embriones de 2-células y embriones d3 viables también se incrementaron.

A pesar de las características reproductivas propias de la cepa NOD/SCID humanizada, en la que se da una baja tasa de gestación en comparación a otras como la C57-BL/6J (Kumagai et al., 2011), se consiguió obtener gestación en tres de los grupos evaluados, así como detectar una tendencia hacia un mayor tamaño en las camadas de las ratonas que habían sido tratadas con BMDSC. Estos resultados preliminares respaldan los posibles efectos del tratamiento de BMDSC sobre la descendencia sin embargo, se necesitaría aumentar el tamaño de la población estudiada para poder justificar dichos resultados estadísticamente.

En definitiva, los resultados obtenidos en este estudio revelan que las BMDSC podrían ser una alternativa clínica para mejorar el nicho ovárico y, por consiguiente, el desarrollo folicular en pacientes con función ovárica dañada. Aunque los efectos rejuvenecedores fueron mayores en la condición de daño severo, nuestros resultados sugieren que las terapias basadas en BMDSC también podrían ser un enfoque adecuado para aquellas situaciones de daño ovárico no graves, incluyendo pacientes de mayor edad y pacientes que muestran una baja respuesta al tratamiento con gonadotropina, es decir, las PR. Sin embargo, se requiere más trabajo antes de considerar esta vía como alternativa real en la práctica clínica.

6. CONCLUSIONES

En resumen, este estudio experimental demuestra que el tratamiento con BMDSC es capaz de promover una mejora en la función ovárica ya que:

- Restaura el ciclo estral, el cual se había visto alterado debido al tratamiento con quimioterapia.
- Favorece el crecimiento folicular a estadios antrales y preovulatorios.
- Aumenta el número de ovocitos MII ovulados y embriones obtenidos en comparación con aquellos ratones que tras la quimioterapia no reciben infusión de BMDSC.
- Mejora la vascularización y promueve la regeneración del nicho ovárico al disminuir la apoptosis y aumentar la proliferación celular en los ovarios.
- Es capaz de dar lugar al nacimiento de camadas más numerosas de crías sanas, incluso en casos de dosis de quimioterapia muy elevadas consideradas esterilizantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ABD-ALLAH, S.H.; SHALABY, S.M.; PASHA, H.F.; EL-SHAL, A.S.; RAAFAT, N.; SHABRAWY, S.M.; AWAD, H.A.; AMER, MG.; GHARIB, M.A.; EL GENDY, E.A.; RASLAN, A.A.; EL-KELAWY, H.M. (2013). Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy.*, 15(1):64-75.
- ALLEN, E. (1922). The oestrus cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy.*, 30:297-371.
- ASTORI, G.; SONCIN, S.; LO CICERO, V.; SICLARI, F.; SÜRDER, D.; TURCHETTO, L.; SOLDATI, G.; MOCSETTI, T. (2010). Bone marrow derived stem cells in regenerative medicine as Advanced Therapy Medicinal Products. *American Journal of Translational Investigation .*, 2 (3):285-295.
- BATCHVAROV, I.S.; TAYLOR, R.W.; BUSTAMANTE-MARIN, X.; CZERWINSKI, M.; JOHNSON, E.S.; KORNBLUTH, S.; CAPEL, B. (2016). A grafted ovarian fragment rescues host fertility after chemotherapy. *Molecular Human Reproduction.*, 22(12):842-851.
- CERVELLO, I.; GIL-SANCHIS, C.; SANTAMARIA, X.; CABANILLAS, S.; DIAZ, A.; FAUS, A.; PELLICER, A.; SIMON, C. (2015). Human CD133 bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertility and Sterility .*, 104(6):1552-1560.
- EGGAN, K.; JURGA, S.; GOSDEN, R.; MIN, I.M.; WAGERS, A.J. (2006). Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature.*, 441(7097):1109-1114.
- EVERS, J.L.(2002). Female subfertility. *Lancet.*, 360(9327):151-159.
- FRASER, H.M. (2006). Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reproductive Biology and Endocrinology.*, 4:18.
- GENEROSO, W.M.; STOUT, S.K.; HUFF, S.W. (1971). Effects of alkylating chemicals on reproductive capacity of adult female mice. *Mutation research.*, 113(2):172-184.
- GOSWAMI, D.; CONWAY, G.S. (2005). Premature ovarian failure. *Human Reproduction Update.*, 11(4): 391-410.
- GREENWALD, G.S. (1972). Of eggs and follicles. *The American journal of anatomy.*, 135(1):1-3.

- HERSHLAG, A.; SCHUSTER, M.W. (2002). Return of fertility after autologous stem cell transplantation. *Fertility and Sterility.*, 77(2):419-421.
- JEMAL, A.; CLEGG, L.X.; WARD, E.; RIES, L.A.; WU, X.; JAMISON, P.M.; WINGO, P.A.; HOWE, H.L.; ANDERSON, R.N.; EDWARDS, B.K. (2004). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer.*, 101:3-27.
- JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; ADAMS, G.B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K.S.; TILLY, J.C.; CORTES, M.L.; FORKERT, R.; SPITZER, T.; IACOMINI, J.; SCADDEN D.T.; TILLY, J.L. (2005). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell.*, 122(2):303-315.
- KALICH-PHILOSOPH, L.; RONESS, H.; CARMELY, A.; FISHEL-BARTAL, M.; LIGUMSKY, H.; PAGLIN, S.; WOLF, I.; KANETY, H.; SREDNI, B.; MEIROW, D. (2013). Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Science Translational Medicine.*, 5(185): 185ra162.
- KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; SUZUKI, N.; DEGUCHI, M.; SATO, Y.; TAKAE, S.; HO, C.H.; KAWAMURA, N.; TAMURA, M.; HASHIMOTO, S.; SUGISHITA, Y.; MORIMOTO, Y.; HOSOI, Y.; YOSHIOKA, N.; ISHIZUKA, B.; HSUEH, A.J. (2013) Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 2110(43):17474-17479.
- KELSEY, T. W.; WRIGHT, P.; NELSON, S. M.; ANDERSON, R. A.; WALLACE, W. H. (2011). A Validated Model of Serum Anti-Müllerian Hormone from Conception to Menopause. *Plos One.*, 6(7), e22024.
- KRYOU, D.; KOLIBIANAKIS, E.M.; VENETIS, C.A.; PAPANIKOLAOU, E.G.; BONTIS, J.; TARLATZIS, B.C. (2009). How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility.*, 91:749-766.
- KUMAGAI, K.; KUBOTA, N.; SAITO, T.; SASAKO, T.; TAKIZAWA, R.; SUDO, K.; KUROKAWA, M.; KADOWAKI, T. (2011). Generation of transgenic mice on an NOD/SCID background using the conventional microinjection technique. *Biology of reproduction.*, 84(4):682-688.

- LA MARCA, A.; SIGHINOLFI, G.; RADİ, D.; ARGENTO, C.; BARALDI, E.; ARTENISIO, A.C.; STABİLE, G.; VOLPE, A. (2010). Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human Reproduction Update.*, 16: 113–130.
- LAI, D.; WANG, F.; CHEN, Y.; WANG, L.; WANG, Y.; CHENG, W. (2013). Human amniotic fluid stem cells have a potential to recover ovarian function in mice with chemotherapy-induced sterility. *BMC developmental biology.*, 13:34.
- LAI, D.; WANG, F.; YAO, X.; ZHANG, Q.; WU, X.; XIANG, C. (2015). Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *Journal of translational medicine.*, 13:155.
- LARSEN, E.C.; MÜLLER, J.; SCHMIEGELOW, K.; RECHNITZER, C.; ANDERSEN, A.N. (2003). Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, 88(11):5307-5314.
- LEE, H.J.; SELESNIEMI, K.; NIKURA, Y.; NIKURA, T.; KLEIN, R.; DOMBKOWSKI, D.M.; TILLY, J.L. (2007). Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.*, 25(22):3198-3204.
- LIU, J.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; LI, N.; WEN, Y.; CAO, F.; AI, H.; XUE, X. (2014). Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Molecules and cells.*, 37(12):865-872.
- MACKLON, N.S.; FAUSER, B.C. (1999). Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Hormone Research.*, 52(4):161-170.
- MAURO, A.; MARTELLI, A.; BERARDINELLI, P.; RUSSO, V.; BERNABO, N.; DI GIACINTO, O.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. (2014). Effect of antiprogestosterone RU486 on VEGF expression and blood vessel remodeling on ovarian follicles before ovulation. *PLoS One.*, 9(4):e95910.
- MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J.W. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian. *Endocrine Reviews.*, 21(2):200-214.

- MCVIE, J.G. (1999). Cancer treatment: the last 25 years. *Cancer Treatment Reviews.*, 5:323-331.
- MEIROW, D. (2000) Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Molecular and Cellular Endocrinology.*, 169(1-2):123-131.
- MUNNÉ, S.; COHEN, J.; SABLE, D. (2002). Preimplantation genetic diagnostic for advanced maternal age and other indications. *Fertility and Sterility.*, 78:234-236.
- NELSON, J.F.; FELICIO, L.S.; OSTERBURG, H.H.; FINCH, C.E. (1981). Altered profiles of estradiol and progesterone associated with prolonged estrous cycles and persistent vaginal cornification in aging C57BL/6J mice. *Biology of Reproduction.*, 24: 784-794.
- NIH Stem Cell Information Home Page. In *Stem Cell Information* (World Wide Web site). Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2016, (visto el 20 de Marzo, 2017). <https://stemcells.nih.gov/info/basics/4.htm>
- NIIKURA, Y.; NIIKURA, T.; TILLY, J.L. (2009). Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging.*, 1(12):971-978.
- PAN, H.A.; WU, M.H.; CHENG, Y.C.; WU, L.H.; CHANG, F.M. (2004). Quantification of ovarian stromal Doppler signals in poor responders undergoing in vitro fertilization with three-dimensional power Doppler ultrasonography. *American journal of obstetrics and gynecology.* 190(2):338-344.
- PANDIAN, Z.; MCTAVISH, A.R.; AUCOTT, L.; HAMILTON, M.P.; BHATTACHARYA, S. (2010) .Interventions for "poor responders" to controlled ovarian hyper stimulation (COH) in -vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Data base of Systematic Reviews.*, (1): p.CD004379.
- PEICHEV, M.; NAIYER, A.J.; PEREIRA, D.; ZHU, Z.; LANE, W.J.; WILLIAMS, M.; OZ, M.C.; HICKLIN, D.J.; WITTE, L.; MOORE, M.A.; RAFII, S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 (+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.*, 95(3):952-958.
- PELLICER, A.; ARDILES, G.; NEUSPILLER, F.; REMOHI, J.; SIMON, C.; BONILLA-MUSOLES, F. (1998). Evaluation of the ovarian reserve in young low responders with normal base levels of follicle-stimulating hormone using three-dimensional ultrasonography. *Fertility and Sterility.*, 70:671-675.

- RICHARDSON, R.B.; ALLAN, D.S.; LE, Y. (2014). Greater organ involution in highly proliferative tissues associated with the early onset and acceleration of ageing in humans. *Experimental Gerontology.*, 55:80-91.
- SALOOJA, N.; CHATTERJEE, R.; MCMILLAN, A.K.; KELSEY, S.M.; NEWLAND, A.C.; MILLIGAN, D.W.; FRANKLIN, I.M.; HUTCHINSON, R.M.; LINCH, D.C.; GOLDSTONE, A.H. (1994). Successful pregnancies in women following single autotransplant for acute myeloid leukemia with a chemotherapy ablation protocol. *Bone marrow transplantation.*, 13(4):431-435.
- SALOOJA, N.; SZYDLO, R.M.; SOCIE, G.; RIO, B.; CHATTERJEE, R.; LJUNGMAN, P.; VAN LINT, M.T.; POWLES, R.; JACKSON, G.; HINTERBERGER-FISCHER, M.; KOLB, H.J.; APPERLEY, J.F. (2001). Pregnancy outcomes after peripheral blood or bone marrow transplantation: a retrospective survey. *Lancet.*, 358(9278):271-276.
- SANDERS, J.E.; HAWLEY, J.; LEVY, W.; GOOLEY, T.; BUCKNER, C.D.; DEEG, H.J.; DONEY, K.; STORB, R.; SULLIVAN, K.; WITHERSPOON, R.; APPELBAUM, F.R. (1996). Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood.*, 87(7):3045-3052.
- SKAZNIK-WIKIEL, M.E.; MCGUIRE, M.M.; SUKHWANI, M.; DONOHUE, J.; CHU, T.; KRIVAK, T.C.; RAJKOVIC, A.; ORWIG, K.E. (2013). Granulocyte colony-stimulating factor with or without stem cell factor extends time to premature ovarian insufficiency in female mice treated with alkylating chemotherapy. *Fertility and Sterility.*, 99(7):2045-2054.
- SUN, M.; WANG, S.; LI, Y.; YU, L.; GU, F.; WANG, C.; YAO, Y. (2013). Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem cell research & therapy.*, 4(4):80.
- TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. (2004). Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reproduction in Domestic Animal.*, 39(4):206-216.
- TINGEN, C.M.; BRISTOL-GOULD, S.K.; KIESEWETTER, S.E.; WELLINGTON, J.T.; SHEA, L.; WOODRUFF, T.K. (2009). Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biology of Reproduction.*, 81(1):16-25.
- VAN BALEN, F.; VERDURMEN, J.E.; KETTING, E. (1997). Age, the desire to have a child and cumulative pregnancy rate. *Human Reproduction.*, 12:623-627.
- VEITIA, R.A.; GLUCKMAN, E.; FELLOUS, M.; SOULIER, J. (2007). Recovery of female fertility after chemotherapy, irradiation, and bone marrow allograft: further evidence against

massive oocyte regeneration by bone marrow-derived germline stem cells. *Stem Cells.*, 25(5):1334-1335.

- VITAL-REYES, V.S. (2010). Evaluación de la reserva ovárica. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción.*, 2(4):89-95.

- VISSER, J.A.; SCHIPPER, I.; LAVEN, J.S.; THEMMEN, A.P. (2012). Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. *Nature Reviews Endocrinology.*, 8(6): 331-341.

- WANG, Z.; WANG, Y.; YANG, T.; LI, J.; YANG, X. (2017). Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem cell research & therapy.*, 8(1):11.

- ZHAI, J.; YAO, G.; DONG, F.; BU, Z.; CHENG, Y.; SATO, Y.; HU, L.; ZHANG, Y.; WANG, J.; DAI, S.; LI, J.; SUN, J.; HSUEH, A.J.; KAWAMURA, K.; SUN, Y. (2016). In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, 101(11):4405-4412.

- ZHANG, H.; RISAL, S.; GORRE, N.; BUSAYAVALLASA, K.; LI, X.; SHEN, Y.; BOSBACH, B.; BRANNSTROM, M.; LIU, K. (2014). Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Current biology: CB.*, 24(21):2501-2508.