



FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**“AVANCES TECNOLÓGICOS EN
REPRODUCCIÓN ASISTIDA”**

Autor: Elena Uriarte Vega

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

Convocatoria: Febrero 2018

ÍNDICE

1	RESUMEN /ABSTRACT	3
2	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	4
2.1	Conceptos relacionados con la fecundación in vitro.....	4
2.2	Células madre	7
3	OBJETIVOS	9
4	MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
5.1	Células germinales a partir de células madre embrionarias e IPS	9
5.2	Bebé medicamento	12
5.3	Transferencia pronuclear	15
6	CONCLUSIONES	17
7	BIBLIOGRAFÍA.....	18

ABREVIATURAS

Fecundación in vitro (FIV)	Células primordiales germinales en la línea celular (PGCLC)
Microinyección espermática introcitoplasmática (ICSI)	Vesícula germinal (GV)
Células madre embrionarias (CME)	Maduración in vitro (IVM)
Células madre pluripotenciales inducidas (iPS)	Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGD)
Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	Sangre de cordón umbilical (SCU)
Gonadotropina menopáusica humana (HMG)	Transferencia nuclear del huso meiótico (SNT)
Hormona foliculoestimulante (FSH)	Transferencia pronuclear (PNT)
	Transferencia del cuerpo polar (PBT)

1 RESUMEN

En el presente trabajo se exponen los últimos avances en reproducción asistida en relación con el papel que desempeñan las células madre. Entre ellos se incluye la oportunidad de salvar vidas gracias al trasplante de células madre de los bebés medicamento. Otro importante logro es la transferencia pronuclear, esta técnica permite que las mujeres que transmiten enfermedades mitocondriales, hasta ahora incurables, puedan tener hijos sanos. Las células madre también han abierto un prometedor camino consiguiendo formar gametos a partir de células madre adultas. Este campo aún está en experimentación, pero podría suponer una gran oportunidad para las parejas que no pueden tener hijos por fallos en los gametos.

PALABRAS CLAVE: célula madre, fecundación in vitro, células pluripotenciales inducidas, bebé medicamento, transferencia pronuclear.

ABSTRACT

In the present work the latest advances in assisted reproduction are exposed in relation to the role played by stem cells. These achievements include the opportunity to save lives thanks to transplant of stem cells of savior sibling. Another important achievement is the pronuclear transfer, this technique allows women who transmit mitochondrial diseases, so far incurable, to have healthy children. Stem cells have also opened a promising path to form gametes from adult stem cells. This field is still at the development stage, but it could be a great opportunity for couples who can not have children because of gamete failure.

KEY WORDS: stem cell, in vitro fertilization, iPS, savior sibling, pronuclear transfer.

2 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 Conceptos relacionados con la fecundación in vitro

La esterilidad es **“un trastorno de la fertilidad humana que se caracteriza por la incapacidad para lograr un embarazo tras un año o más de relaciones sexuales habituales y sin ningún método anticonceptivo”**^{1,2}.

La esterilidad se puede se puede clasificar en primaria, que incluye a las parejas que nunca han conseguido un embarazo; y en secundaria que se atribuye a las parejas que alguna vez han tenido un embarazo, ya sea con un nacido vivo o con un aborto³.

La infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo que se define como **“la incapacidad de lograr gestaciones capaces de desarrollar un feto viable después de un año o más de relaciones sexuales no protegidas”**².

Existen dos tipos de infertilidad: la primaria se refiere a las mujeres que tras quedarse embarazadas no han conseguido tener un recién nacido vivo; y se considera secundaria si las mujeres después de haber llevado a cabo un embarazo y parto normal, no consiguen llevar a término un nuevo embarazo³.

En los países occidentales el 15% de la población en edad reproductiva tienen problemas de esterilidad, el incremento de esta enfermedad en los países desarrollados se debe principalmente al aumento progresivo de la edad de la maternidad⁴.

En el momento actual, España gracias a su legislación y a la calidad de sus numerosos centros, es líder europeo en tratamientos con ovodonación siendo además probablemente el tercer país en Europa en número de tratamientos^{2,4}.

Dentro de la reproducción asistida nos vamos a centrar en la fecundación in vitro (FIV) y la microinyección espermática (ICSI).

Las situaciones en las que se recurre a la fecundación in vitro son: fracasos de inseminación, obstrucción o ausencia de trompas de Falopio, endometriosis graves, trastornos de la ovulación que no se han podido resolver con otros tratamientos, alteraciones inmunológicas con trascendencia reproductiva, fracaso en otros

tratamientos previos, motivo desconocido de esterilidad o infertilidad, necesidad de diagnóstico genético preimplantacional².

En la **fecundación in vitro** se ponen en contacto los espermatozoides y los ovocitos para conseguir la fecundación y el desarrollo embrionario inicial fuera del organismo de la mujer. Para ello es necesario al menos 25.000 espermatozoides por ovocito.

La **microinyección espermática** es una variedad de la anterior y consiste en introducir un espermatozoide en el interior de cada ovocito³.

Fases de la fecundación in vitro ^{2,3}:

I. Estimulación ovárica

Para obtener el número de ovocitos necesarios para llevar a cabo la fecundación in vitro, tanto si se trata de la convencional como de la microinyección, es necesario realizar un tratamiento de estimulación hormonal de ovarios de manera controlada mediante administración de fármacos. Se pueden combinar distintos tipos de fármacos:

- Análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH): tanto agonistas como antagonistas.
- Diferentes tipos de gonadotropinas: HMG, LH, FSH recombinante o urinaria
- Inductores de la ovulación: letrozol o citrato de clomifeno.

Con esta fase se consigue: bloquear los mecanismos fisiológicos de control del ciclo ovárico, estimular el desarrollo de varios folículos ováricos, provocar la maduración final de los ovocitos y desencadenar los mecanismos de ovulación en un momento específico, el cual servirá de referencia para programar la extracción de los ovocitos.

II. Punción ovárica

La punción ovárica es una intervención ambulatoria en la que se extraen los ovocitos maduros bajo control ecográfico y anestesia.

III. Fertilización in vitro y cultivo embrionario

Los espermatozoides se pueden obtener a partir de una muestra de semen, o también es posible adquirirlos a través de una punción del epidídimo o de una biopsia testicular.

Para seleccionar los espermatozoides que serán utilizados en las técnicas de fecundación, todas las muestras serán sometidos a una preparación en el laboratorio.

En la FIV convencional, se ponen en contacto 25.000 espermatozoides aproximadamente con cada uno de los ovocitos.

Sin embargo, en la ICSI, se introduce un solo espermatozoide en el citoplasma del óvulo.

Tras cultivar los embriones varios días en el laboratorio, se clasifican según su calidad con la finalidad de proponer a los pacientes un número adecuado para su transferencia.

IV. Trasferencia de embriones

La transferencia embrionaria consiste en introducir dentro del útero de la paciente los embriones seleccionados en la fase anterior.

Es un proceso indoloro, que no necesita anestesia y que se lleva a cabo con una cánula muy fina que permite acceder al fondo del útero y colocar ahí los embriones. La paciente deberá recibir un tratamiento hormonal para favorecer que el embarazo sea viable.

V. Criopreservación de embriones sobrantes

Los embriones evolutivos que no se transfieren al útero se criopreservan para poder ser utilizados, en el caso de que no se logre gestación o que se quiera tener otro hijo, todo ello sin necesidad de que la paciente vuelva a pasar por las fases más complejas de la técnica.

2.2 Células madre

Una célula madre o troncal (*stem cell*) es aquella que tiene la capacidad de dividirse simultáneamente para preservar por un lado su **autorrenovación**, es decir, generar más células madre con las mismas propiedades que la original, y por otro lado, originar células hijas con capacidad de **diferenciarse** en distintos tipos celulares con características y funciones especializadas, siempre que se encuentran bajo las condiciones apropiadas del microambiente^{5,6,7}.

A continuación, se va a explicar con más detalle los tipos de células madre que están relacionadas con los tratamientos de reproducción asistida.

Las **células madre embrionarias** (CME) se obtienen de la masa celular interna del embrión de los mamíferos en la etapa de blastocisto. Entre sus características más importantes destacan que, *in vitro*, son capaces de multiplicarse ilimitadamente y a su vez mantener su pluripotencialidad, es decir, pueden diferenciarse en cualquier tejido del organismo.

Las **células madre somáticas o adultas** son aquellas que se encuentran en tejidos específicos de un organismo totalmente desarrollado. Están presentes en la médula ósea, tejido neuronal, epidérmico, gastrointestinal, músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, páncreas y pulmón^{8,9}.

En un principio se consideraba que las células madre adultas sólo podían diferenciarse en un tipo celular del mismo tejido de origen, en los últimos años se han realizado varios estudios que sugieren que las células madre adultas son capaces de diferenciarse en tejidos derivados de otras capas embrionarias, siendo el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas. Este fenómeno se denomina versatilidad o transdiferenciación y se cree que se debe al cambio de su programa de diferenciación como respuesta a las nuevas señales que reciben debidas a la sustitución de su entorno natural por otro^{7,8,9}.

Las **células madre mesenquimales** son células adultas con morfología de fibroblastos. Poseen una gran plasticidad hacia diversos linajes celulares como condrocitos, osteocitos, adipocitos e incluso pueden diferenciarse en neuronas en

determinadas condiciones. Son consideradas multipotentes porque son capaces de diferenciarse en tejidos derivados de ectodermo y mesodermo, pero no del endodermo⁹. Estas células se encuentran principalmente en médula ósea, sangre de cordón umbilical y tejido adiposo. Se ha demostrado que estas células son necesarias para el mantenimiento y expansión de células madre hematopoyéticas derivadas de la médula ósea de adultos y de la sangre del cordón umbilical. Además, son capaces de dirigirse donde hay inflamación y si se inhalan son capaces de llegar en una hora a las zonas donde se encuentra la lesión salvando la barrera hematoencefálica. Estas células suponen un amplio potencial en trasplantes de médula ósea, enfermedades autoinmunes, enfermedades degenerativas, vehículo de virus y fármacos y trasplante de órganos entre otras¹⁰.

Las **células pluripotentes inducidas o iPS** son células adultas maduras reprogramadas para que pierdan su identidad y se conviertan en células pluripotentes con características similares a las embrionarias. En agosto de 2006 Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka publicaron en la revista Cell, la primera descripción de las células troncales pluripotentes inducidas. Identificaron los cuatro genes que jugaban un papel esencial en la formación de las iPS, éstos eran Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc (denominados genes Yamanaka). A través de retrovirus portadores de la secuencia génica de los cuatro genes, se llevaba a cabo la transformación celular. Los ensayos fueron realizados con unos fibroblastos de ratón mutados (knockout) para el gen Fbx15, específico en células embrionarias pero no indispensable, en los que este locus dirigía la expresión de un cassette de resistencia al antibiótico G418. Únicamente las combinaciones génicas que conseguían transformar las células somáticas en células madre pluripotentes eran las que posibilitaban la activación del locus Fbx15 y expresar la resistencia al antibiótico. Con este trabajo demostraron que morfológicamente, y en relación a los marcadores específicos, las iPS eran iguales a las células troncales embrionarias, con la única diferencia de su procedencia^{11,12,13}.

A partir de este momento se han publicado muchos trabajos que demuestran la reproducibilidad y que han permitido incrementar el conocimiento sobre las aplicaciones de las iPS.

3 OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- Recopilar información sobre los últimos métodos de reproducción asistida
- Reflejar la importancia de las células madre en medicina reproductiva
- Identificar cuáles de estos métodos tienen una aplicación clínica
- Señalar futuras vías de investigación en este campo

4 MATERIAL Y MÉTODOS.

Para la elaboración de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva del tema tratado, utilizando diversas fuentes de información. Se han consultado bases de datos, libros de texto, artículos científicos, libros electrónicos, videos, revistas científicas y páginas web con el fin de obtener la información más reciente a través de las palabras clave. En el apartado de bibliografía se encuentra el listado completo.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Células germinales a partir de células madre embrionarias e IPS

Se han conseguido formar óvulos y espermatozoides en ratones a partir de las células madre pluripotenciales inducidas y las células madre embrionarias

En 2011, Cristina Eguizabal y sus colaboradores lograron la diferenciación completa de iPS de humanos a células postmeióticas. En comparación con informes previos, en los que se utilizaban CME, las células postmeióticas surgieron sin la sobreexpresión de factores de transcripción relacionados con la línea germinal. Además, obtuvieron sistemáticamente células haploides de iPS tanto de queratinocitos como de sangre del cordón umbilical, producidas estas células con distinto número de factores de transcripción y de los dos sexos¹⁴.

En 2016, el equipo de investigadores de Katsuhiko Hayashi logró obtener óvulos, que tras fecundarlos in vitro y transferir los embriones a ratones hembra produjeron descendencia sana y fértil.

Las CME e iPS se inducen primero a células primordiales germinales en la línea celular (PGC) que a su vez se agregan con células somáticas de las gónadas embrionarias femeninas. La inducción de PGCs—seguida de la agregación con las células somáticas dura hasta 8 días. Luego, las agregaciones se trasplantan debajo de la bolsa ovárica, en la cual los PGC crecen hasta ovocitos en estado de vesícula germinal (GV) aproximadamente en 1 mes. Los ovocitos GV derivados de PGCLC se pueden madurar en ovarios en 1 día por maduración in vitro (IVM), y se pueden fertilizar con espermatozoides mediante fertilización in vitro (FIV) para obtener descendencia sana y fértil. Este método proporciona un primer paso hacia la reconstitución de todo el proceso de ovogénesis in vitro¹⁵.

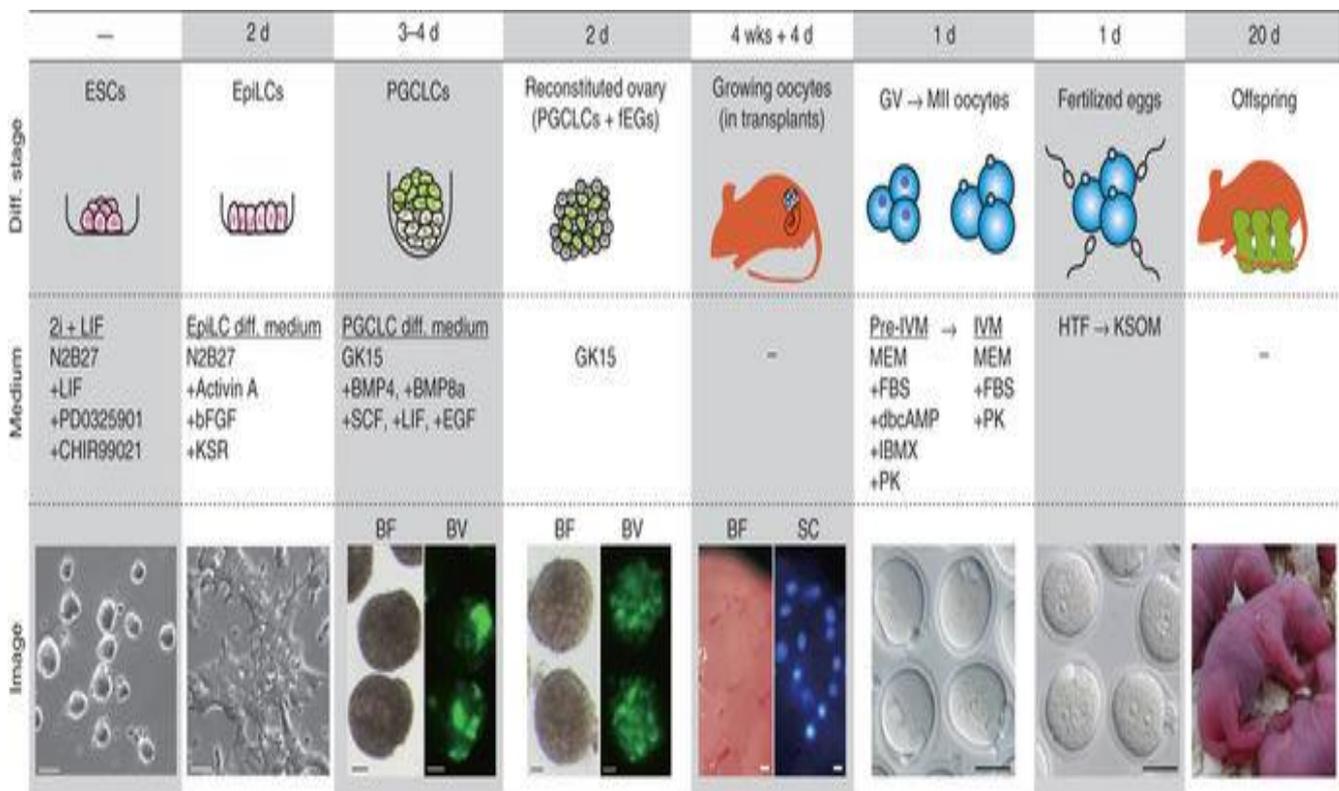


Figura 1. Esquema de la formación de ovarios a partir de iPS (Hayashi K, Nature 2013;8(8):1513)

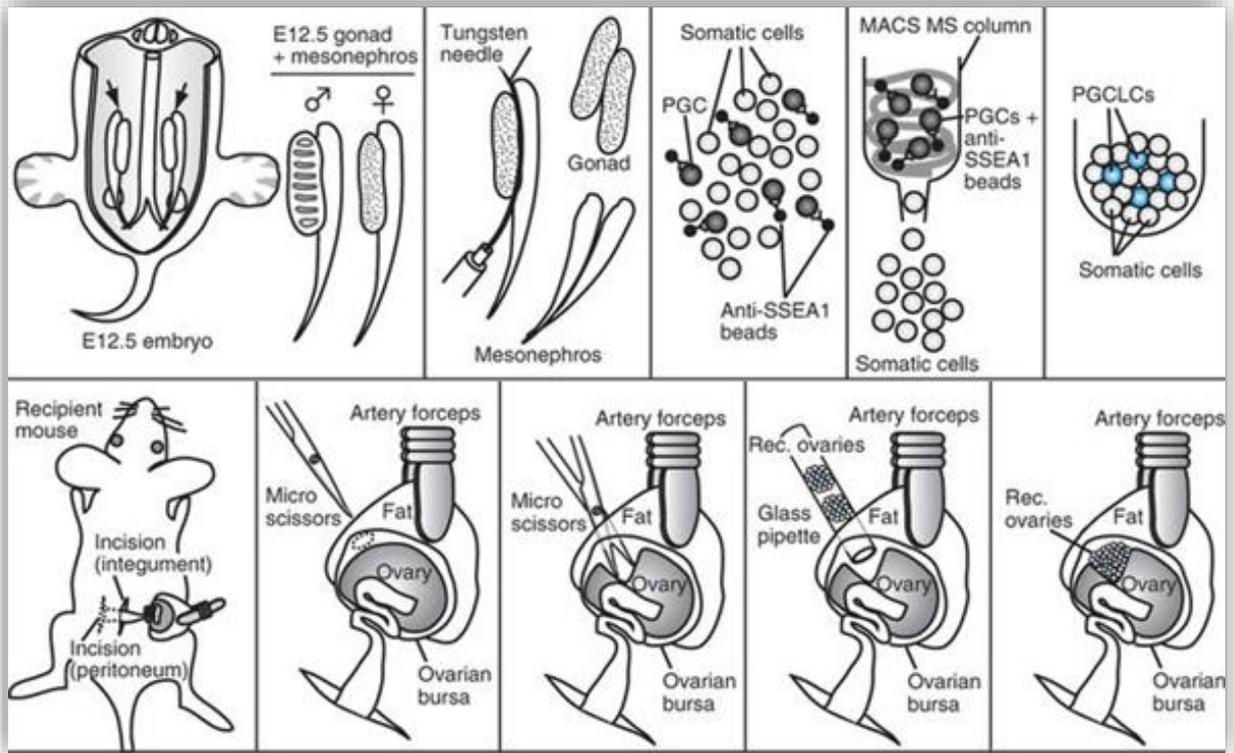


Figura 2. Procedimiento de la reconstitución y trasplante de ovario

(Hayashi K, Nature 2013;8(8):1513)

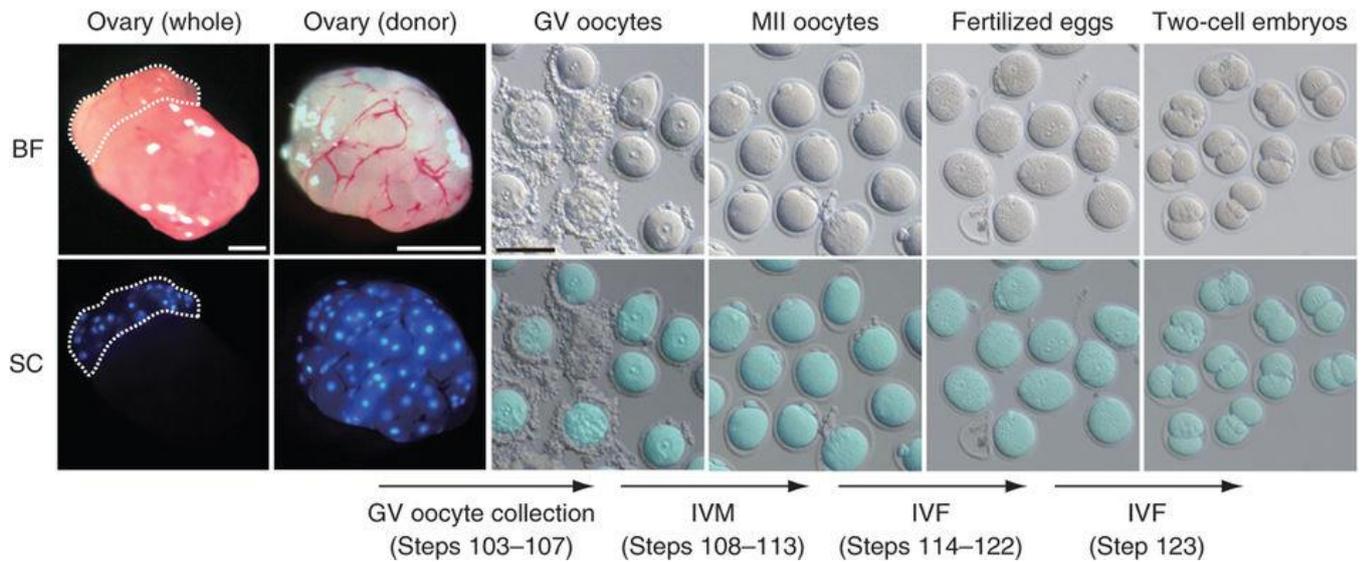


Figura 3: Recolección, maduración y fertilización de los ovocitos derivados de PGCs en microscopía de campo brillante (BF) y microscopía de fluorescencia (SC).

(Hayashi K, Nature 2013;8(8):1513)

La producción de gametos in vitro es un campo que continua en desarrollo. Esta técnica podría suponer una gran esperanza para todas aquellas parejas con problemas de infertilidad. También dentro de las fases de la fecundación in vitro supondría prescindir de las etapas de hiperestimulación y punción ovárica evitando los efectos adversos que conllevan. Gracias a las células iPS se evita el problema ético de uso de embriones humanos y además ayudará a comprender mejor los procesos moleculares de la diferenciación de los gametos, lo que supondrá una mejora en los métodos para la producción de gametos in vitro funcionales en humanos.

5.2 Bebé medicamento

El único tratamiento existente para los trastornos sanguíneos es el trasplante de células madre hematopoyéticas. La tasa de éxito del tratamiento es mucho mayor si el donante es un hermano compatible¹⁶. Por este motivo, hay familias afectadas que optan por tener bebés que sean HLA compatibles con el hijo enfermo, seleccionándolos a través del **diagnóstico genético preimplantacional (PGD)**¹⁷. Esta técnica se ha utilizado para la prueba de los trastornos monogénicos.

El procedimiento consiste en una estimulación ovárica de la madre para poder fecundar varios óvulos y generar el mayor número posible de embriones. En el siguiente paso se toman una o dos células de los embriones en estadios muy tempranos, normalmente de ocho células, y se las somete a un examen genético con el fin de determinar si hay enfermedades genéticas que pueden transmitirse a la descendencia y comprobar la histocompatibilidad de los embriones con el sistema inmunitario del futuro receptor. A partir del resultado obtenido, se seleccionan uno o dos embriones compatibles para implantarlos en el útero de la madre. Una vez que el bebé ha nacido, se recolecta la sangre del cordón umbilical, se procesa y con ella se realiza un trasplante de células madre al hermano enfermo^{16,17,18}.

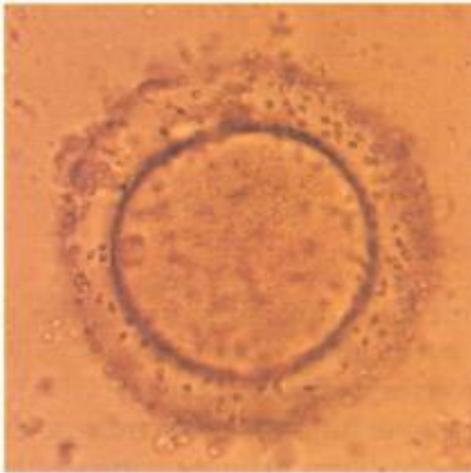


Figura 4: Fecundación in vitro convencional

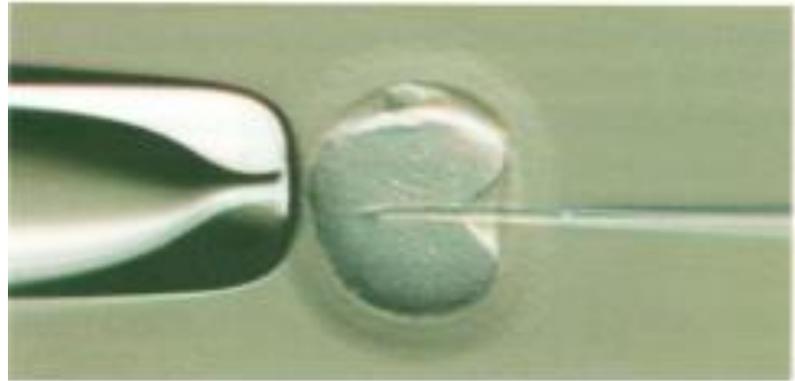


Figura 5: Microinyección intracitoplasmática del espermatozoide

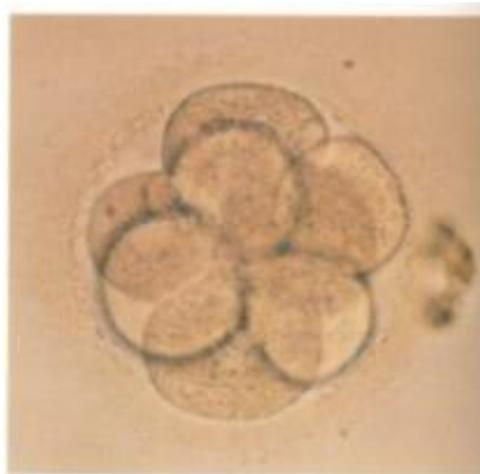


Figura 5: Embrión grado II, de ocho células, el día 3, después de fecundación in vitro

(Patrizio P., Atlas de reproducción asistida McGraw-Hill: 2004)

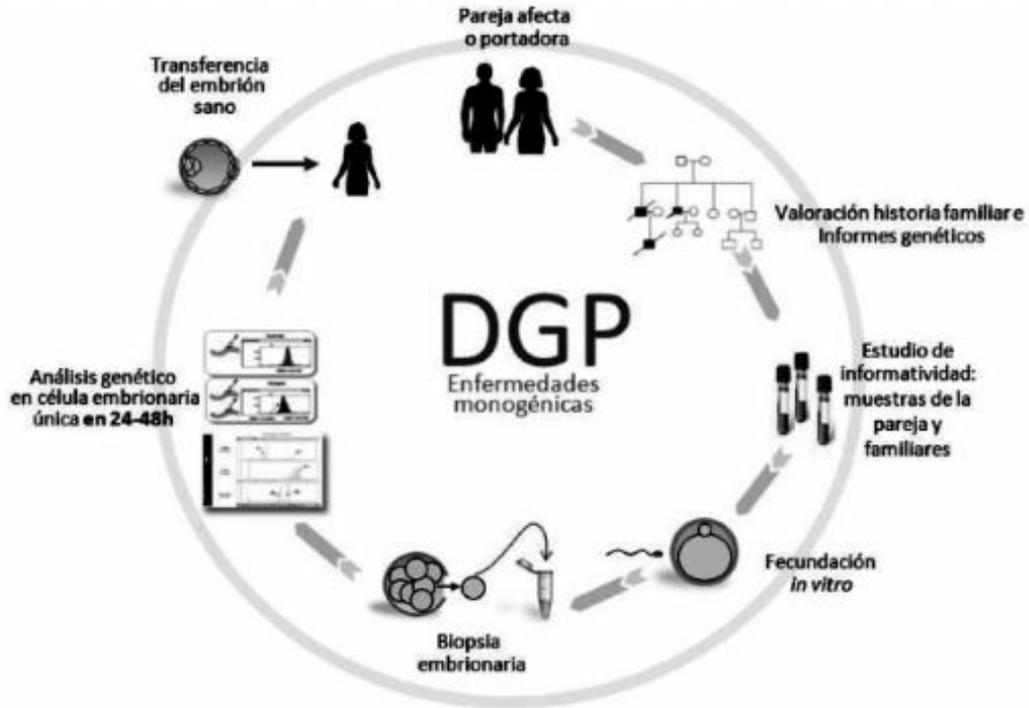


Figura 6: Proceso de DGP

(Vendrell X. La genética reproductiva. Pensamiento Revista de Investigación e Información Filosófica 2017)

El primer bebé medicamento nació en Estados Unidos en el año 2000. Pasados dos años, una pareja inglesa se trasladó a Estados Unidos para tener un hijo que pudiera salvar a su hermano que padecía beta-talasemia mayor, un trastorno profundo de la síntesis de hemoglobina que afecta a la hematopoyesis.

En España en el año 2008, en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, se realizó el primer trasplante de sangre de cordón umbilical (SCU) siendo además el primer bebé medicamento con HLA idéntico a su hermano, el cual padecía beta-talasemia mayor²⁰.

En 2012, en el mismo hospital de Sevilla nace el segundo bebé medicamento para salvar a su hermano de una aplasia medular, siendo esta la única manera de salvar a su hijo tras haber intentado sin resultado, tratamientos inmunosupresores y tras solicitar un donante no emparentado al Registro Español de Donantes de Médula.

Para todas aquellas parejas que tienen un hijo que padece alguna enfermedad sanguínea, concebir un hijo genéticamente compatible ha supuesto la solución más factible para salvar la vida de su hijo.

5.3 Transferencia pronuclear

Las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo, caracterizadas por el fallo en el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos trastornos no tienen tratamiento conocido y son graves en su mayoría^{21,22}.

En reproducción asistida, una de las primeras propuestas para evitar las enfermedades mitocondriales fue utilizar el **diagnóstico genético preimplantacional** (PGD). La finalidad era seleccionar los embriones libres de la mutación e implantarlos en el útero materno interrumpiendo así el patrón de herencia de la enfermedad²³.

Cuando el PGD no es apropiado, las enfermedades mitocondriales se pueden evitar por transferencia nuclear del huso meiótico (SNT), transferencia pronuclear (PNT) o transferencia del cuerpo polar (PBT)²³.

En 2009, el grupo de investigadores de Tachibana dieron a conocer el nacimiento de crías de monos Rhesus en los que remplazaron los genes mitocondriales a través de transferencia nuclear²⁴.

En septiembre 2016, nace el primer niño concebido por fecundación in vitro por transferencia nuclear para evitar el síndrome de Leigh. Esta enfermedad mitocondrial se caracteriza por trastornos degenerativos multisistémicos que aparecen en el primer año de vida, disfunciones del tallo cerebral y de los ganglios basales, desmielinización, regresión psicomotora, así como retraso en el desarrollo, ataxia, convulsiones y neuropatía periférica²⁵.

La técnica a la que recurrieron los médicos fue la transferencia nuclear del huso meiótico para evitar la destrucción de embriones ya que por motivos religiosos iba en contra de las creencias de la pareja.

Primero se extrajo el núcleo de un óvulo de la madre y al óvulo de la donante se le retiró su núcleo. Seguidamente, se introdujo el núcleo de la madre en el óvulo de la donante. Mediante microinyección espermática se fecundó al óvulo resultante. De los cinco óvulos reconstituidos y fertilizados por ICSI, sólo cuatro se transformaron en blastocistos. A través del PGD, se observó que sólo un blastocisto era euploide mientras que los otros tres eran aneuploides. El blastocisto euploide se colocó en el útero de la madre dando como resultado un embarazo sin complicaciones con el parto de un niño sano a las 37 semanas de gestación²⁶.

En la transferencia pronuclear (PNT) primero se fertilizan con el espermatozoide del padre los dos óvulos, el de la madre y el de la donante. Después, se retira el núcleo de los dos cigotos formados, conservando únicamente el núcleo resultante de la fusión de los gametos de los padres. Ese núcleo se introduce en el embrión de la donante. Por último, el embrión resultante se introduce en el útero de la madre.

Estas técnicas suponen una esperanza para las enfermedades mitocondriales, que actualmente no tienen tratamientos efectivos y que por tanto son incurables.

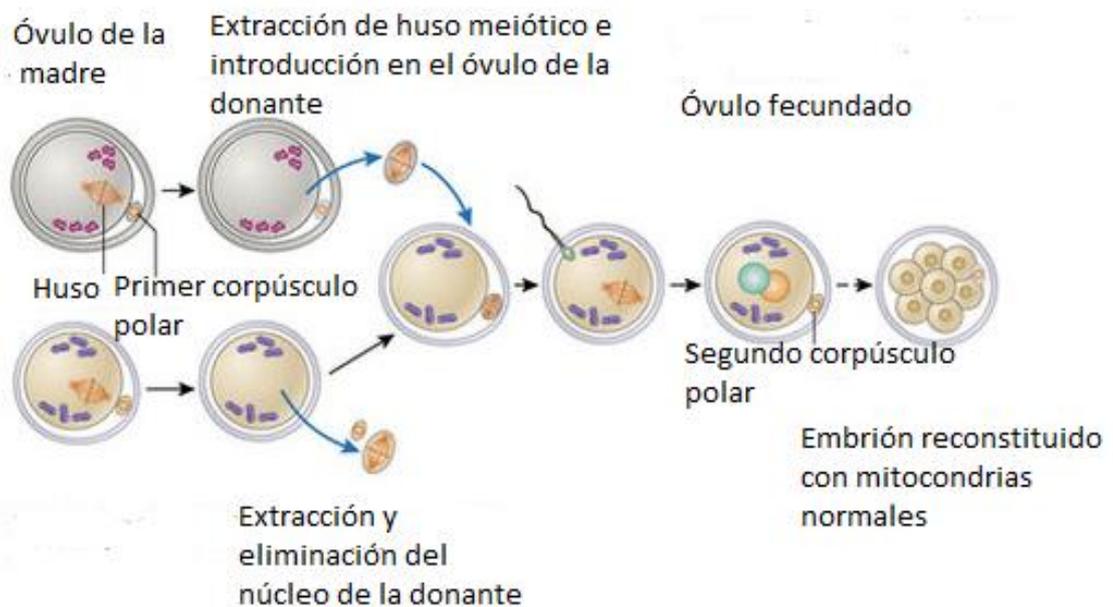


Figura 7. Esquema de transferencia nuclear del huso meiótico.

(Greenfield A., Nature 2017; 35(11):1059-1068.)

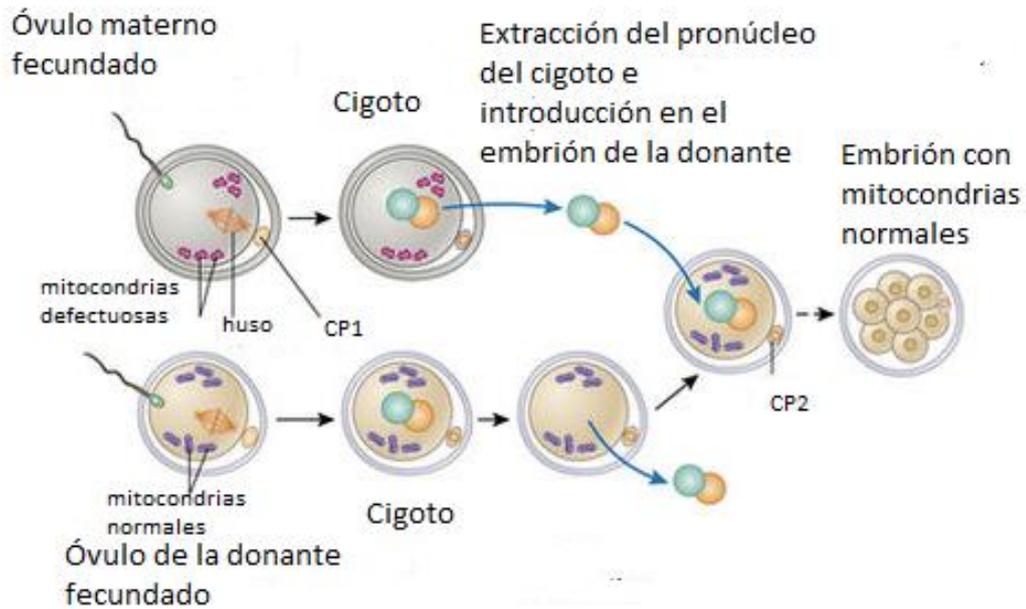


Figura 8: Esquema de transferencia pronuclear

(Greenfield A., Nature 2017; 35(11):1059-1068.)

6 CONCLUSIONES

- 1) La formación de óvulos a partir de células madre adultas supone un gran avance en la reproducción asistida.
- 2) En el momento que llegue a la clínica supondría la eliminación de las dos primeras fases de la fecundación in vitro, evitando el tratamiento hormonal con fármacos y el posible riesgo de embarazo múltiple.
- 3) También permitiría que las mujeres estériles tuvieran hijos con su mismo material genético sin tener que recurrir a la donación de óvulos.
- 4) Gracias al descubrimiento de las iPS puede evitarse el uso de embriones para la obtención de células madre pluripotenciales, siendo una solución a este problema ético.
- 5) Actualmente las iPS se utilizan como modelo in vitro de enfermedades para desarrollar medicamentos, pero aún queda mucho por investigar hasta conseguir que puedan utilizarse en la práctica clínica en humanos frente a la infertilidad.
- 6) La transferencia pronuclear supone la mejor opción para parejas portadoras de enfermedades mitocondriales de tener un hijo sano con el material genético de ambos padres.

- 7) En 2016 nació el primer niño con esta técnica, por lo que todavía hay que controlar que a largo plazo no haya problemas derivados de la técnica.
- 8) El bebé medicamento es la solución más factible para asegurar la salvación de una persona con una enfermedad sanguínea.
- 9) Este tipo de avance supone problemas de tipo ético-religioso que hay que tener presente.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. OMS | Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Who.int. 2017.
2. Saber más sobre fertilidad y reproducción asistida. Madrid: Sparafucile\Mashica, SEF; 2012.
3. Fertilidad G. La Esterilidad e Infertilidad [Internet]. Ginefiv. 2017. Available from: https://www.ginefiv.com/ei_esterilidad_infertilidad.aspx
4. Matorras Weinig J. Libro blanco sociosanitario. Las Matas, Madrid: Imago Concept & Image Development; 2011.
5. Prósper F, Verfaillie C. Células madre adultas. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2003;26(3).
6. Inaba M, Yamashita Y. Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness. Cell Stem Cell. 2012;11(4):461-469.
7. Hernández P, Dorticós E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2004;20(3).
8. Rodríguez-Pardo, VM. Células madre: conceptos generales y perspectivas de investigación. Universitas Scientiarum [Internet]. 2005;10(1):5-14.
9. Prósper F, Herreros J. Células madre adultas. Revista Argentina de Cardiología. 2004;(72):68-73.
10. Arévalo J, Páez D, Rodríguez V. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. Publicación científica en ciencias biomédicas. 2007;(5):101-212.
11. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663-76.

12. Lisker-Y R. Células troncales pluripotenciales inducidas. *Revista de Investigación Clínica*. 2010;(62):396-397.
13. Chaparro O, Beltrán O. Reprogramación nuclear y células pluripotentes inducidas. *Revista Medica* 2009;17(2).
14. Eguizabal C, Montserrat N, Vassena R, Barragan M, Garreta E, Garcia-Quevedo L, et al. Complete Meiosis from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS*. 1 de agosto de 2011; 29(8):1186-95.
15. Hayashi K, Saitou M. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. agosto de 2013;8(8):1513.
16. Moyano G, María L, Pellicer García B, Buil Tricas B, Juárez Vela R, Guerrero Portillo S, et al. Análisis bioético de la generación de «bebés medicamento». *Rev Bioét Derecho*. 2016;(36):55-65.
17. Trujillo J, Surralles J. Savior siblings and Fanconi anemia: analysis of success rates from the family's perspective. *Genetics in Medicine*. 2015;17(11):935-938.
18. Vendrell X. La genética reproductiva. *Pensamiento Revista de Investigación e Información Filosófica*. 2017;73(276):527.
19. Dobson R. "Saviour sibling" is born after embryo selection in the United States. *BMJ*. 2003;326(7404):1416-b-0.
20. Pinto Palacios F. Nacidos para salvar. Un análisis constitucional del «bebé medicamento» // Born to save. A constitutional analysis of the "saviour sibling". *Revista de Derecho Político*. 2016;1(97):243.
21. Greenfield A, Braude P, Flinter F, Lovell-Badge R, Ogilvie C, Perry A. Assisted reproductive technologies to prevent human mitochondrial disease transmission. *Nature Biotechnology*. 2017;35(11):1059-1068.
22. Otten, A.B. & Smeets, H.J. Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and ageing. *Hum. Reprod. Update* 21, 671–689 (2015).
23. Piña-Aguilar R. Prevención de enfermedades mitocondriales: una esperanza a través del uso de técnicas de reproducción asistida. *Gaceta Médica de México*. 2011;(147):172-175.
24. Costa-Borges N., Santamaría X., Calderón G. Transferencia del huso meiótico para transferencia de enfermedades mitocondriales: más cerca de la aplicación clínica. *Asebir*. 2013;18: 6-9.
25. Solano A., Playán A., López-Pérez Manuel J., Montoya J. Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud pública Méx*. 2001 Abr ;43(2): 151-161

26. Zhang J, Liu H, Luo S, Chavez-Badiola A, Liu Z, yang m et al. First live birth using human oocytes reconstituted by spindle nuclear transfer for mitochondrial DNA mutation causing Leigh syndrome. *Fertility and Sterility*. 2016;106(3):375-376.
27. Patrizio P, Tucker M, Guelman V. Atlas de reproducción asistida. México: McGraw-Hill; 2004.
28. EuroStemCell. Stem cells- the future. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=Q9-4SMGiKnE> ; 2012.
29. Cecilia Fabres V. Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2010;21(3):488-493.
30. Patricio Donoso P, Pablo Sanhueza R. Riesgos y complicaciones de los tratamientos de infertilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2010;21(3):457-462.
31. Aran B, Sole M, Rodriguez-Pizà I, Parriego M, Muñón Y, Boada M et al. Vitriified blastocysts from Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) as a source for human Embryonic Stem Cell (hESC) derivation; 2012
32. Miguel Antón Ámez-Segovia. Células inducidas (IPS) y mesenquimales: nuevas terapéuticas; Abril 2012.
33. Vogel G. Breakthrough of the year. Reprogramming cells. *Science* 2007; 322: 1766-7.
34. Richardson J, Irving L, Hyslop L, Choudhary M, Murdoch A, Turnbull D et al. Concise Reviews: Assisted Reproductive Technologies to Prevent Transmission of Mitochondrial DNA Disease. *STEM CELLS*. 2015;33(3):639-645.
35. Yabuuchi A, Beyhan Z, Kagawa N, Mori C, Ezo K, Kato K et al. Prevention of mitochondrial disease inheritance by assisted reproductive technologies: Prospects and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2012;1820(5):637-642.
36. Yalcinkaya T. M., Sittadjody S., Opara E. C. Scientific principles of regenerative medicine and their application in the female reproductive system. *Maturitas*. 2014; 77(1):12-19
37. Stoltz J-F, de Isla N, Li YP, et al. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. *Stem Cells International*. 2015;2015:734731.