



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



HOSPITAL UNIVERSITARIO
RÍO HORTEGA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

MÁSTER EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

**MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA
INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN
HUMANA ASISTIDA**

Irina Rebollo Mato

Valladolid, 2023

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Beatriz, que me ha enseñado con la mejor de las sonrisas la parte más bonita de este apasionante campo, así como su importancia a nivel humano, con su paciencia y dedicación. También a Marta, que transmite alegría y ganas de seguir formándome e interesándome por esto. Dar las gracias a las ginecólogas de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Río Hortega, así como a las enfermeras y todo el equipo, por mostrarme la parte cercana al paciente y todos los aspectos de la consulta. A todas ellas por enseñarme lo que es el verdadero trabajo en equipo en el día a día y la coordinación que hace cosas tan bonitas como ayudar a personas que lo desean ser mamás y papás. Qué bonito. Y por supuesto, agradecer a los pacientes, por hacer que sea posible el aprendizaje.

Agradecer a mis amigos por escuchar y compartir conmigo experiencias que lo hacen más interesante.

Por último, dar las gracias a mis padres por el apoyo, animarme a formarme en lo que me gusta, tener paciencia y siempre saber aconsejarme, y a Antonio, por estar ahí en todo momento y creer y confiar en mí, y hacerlo todo mucho más fácil y más bonito, que valga la pena.

Todo el esfuerzo del mundo no importa si no estás inspirado

- Chuck Palahniuk

RESUMEN - ABSTRACT

Los modelos experimentales suponen, desde hace cientos de años, un gran avance en investigación, pero sobre todo en la rama biomédica, donde se permite, de forma no invasiva para el humano, estudiar y averiguar aspectos hasta el momento desconocidos dependiendo de la fisiología. Se detallan estudios moleculares relevantes en la calidad espermática, ovocitaria y embrionaria; el uso del modelo animal en el ámbito de la reproducción; cultivos celulares variables pero basados en los modelos clásicos; y novedosas aplicaciones de cultivos tridimensionales que engloban distintas características celulares independientes entre sí pero integradas al mismo tiempo. En esta revisión, se pretende dar unas pinceladas globales sobre los modelos experimentales existentes y estudios interesantes aplicados a la Reproducción Humana Asistida, las ventajas que ello supone y de qué manera se abordan, representando la importancia que supone el uso del modelo experimental y la investigación para la mejora de las tasas reproductivas, así como límites que se pueden encontrar y los horizontes que aportan como nuevas estrategias terapéuticas en un futuro, o avances en la comprensión de diversas situaciones patológicas y el beneficio que siempre va a suponer para la especie humana.

Experimental models have been, for hundreds of years, a great advance in research, but especially in the biomedical field, where it is possible, in a non-invasive way for humans, to study and find out aspects that were unknown until now depending on physiology. Relevant molecular studies on sperm, oocyte and embryo quality; the use of the animal model in the field of reproduction; variable cell cultures but based on classical models; and novel applications of three-dimensional cultures that involve different cellular characteristics independent of each other but integrated at the same time are detailed. In this review, we intend to give a global overview of the existing experimental models and interesting studies applied to Assisted Human Reproduction, the advantages that this implies and how they are approached, representing the relevance of the use of the experimental model and research for the improvement of reproductive rates, as well as the limits that can be found and the horizons that they provide as new therapeutic strategies in the future, or advances in the understanding of various pathological situations and the benefit that will always be of benefit to the human species.

ABREVIATURAS

ASEBIR = Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

Ep^{cl} = células epiteliales ciliadas del endocérvix

EPI = epiblasto

Ep^{sec} = células epiteliales secretoras del endocérvix

FIV = fecundación *in vitro*

FSH = hormona folículo estimulante

ICSI = microinyección intracitoplasmática de espermatozoides

isomiR = isoforma de microRNA

ME = metabolitos de estrógenos proangiogénicos

miRNA = microRNA

MIV = maduración *in vitro*

mRNA = ARN mensajero

PrE = endodermo primitivo

q-PCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RNA-seq = secuenciación de ARN

ROS = especies reactivas de oxígeno

RT = retrotranscripción inversa

RT-q-PCR = reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con retrotranscripción inversa

SEF = Sociedad Española de Fertilidad

SCT = sincitiotrofoblasto

SOP = síndrome de ovario poliquístico

TE = trofoectodermo

TRA = técnicas de reproducción asistida

vCTB = citotrofoblastos vellosos

VEGF = factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	pág.5
2. OBJETIVOS.....	pág.9
3. MATERIAL Y MÉTODOS – ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE ESTUDIOS.....	pág.9
4. SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	pág.11
5. DISCUSIÓN.....	pág.13
6. CONCLUSIONES.....	pág.15
7. BIBLIOGRAFÍA.....	pág.16

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción asistida es una rama de la medicina que se enfoca en ayudar a un individuo o pareja con problemas de fertilidad a lograr el embarazo y el nacimiento de un hijo, asegurando, mediante técnicas y tratamientos que reemplazan el proceso natural de reproducción y que ayudan a vencer los problemas médicos o riesgos genéticos existentes, tener descendencia sana¹. Sin embargo, es importante destacar que estos procedimientos pueden ser complejos, costosos y conllevan aspectos éticos y emocionales significativos².

Alrededor del 15% de las parejas españolas en edad reproductiva en el año 2023, según la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), se estima que se encuentran con dificultades a la hora de concebir, habiendo aumentado esta cifra en los años previos debido a diversos factores, como son el retraso en la edad de maternidad o paternidad, los cambios en el estilo de vida y los factores ambientales, a lo que contribuye el envejecimiento poblacional³. De esta manera, en respuesta a la mayor demanda de ayuda para abordar la problemática de la concepción, se ha experimentado un aumento considerable de los tratamientos de reproducción asistida (TRA)⁴.

Para comprender mejor los mecanismos involucrados en la infertilidad y esterilidad, así como en la propia reproducción y en las técnicas utilizadas en el ámbito clínico⁵, se utilizan diferentes modelos experimentales en la investigación científica.

Los modelos experimentales son representaciones simplificadas de la realidad utilizados como herramientas para estudiar y comprender fenómenos biológicos, médicos, físicos u otros aspectos de interés en un entorno controlado. Cada modelo tiene sus ventajas y limitaciones, y la elección del mismo depende de los objetivos de estudio, la finalidad del proyecto o investigación principal y las cuestiones específicas que se quieran abordar. La correcta adecuación del modelo permite obtener de manera menos invasiva resultados más exactos y precisos^{3,6}. Su importancia en reproducción humana asistida radica en que permiten investigar los mecanismos subyacentes fisiológicos, como por ejemplo la interacción embrión-placenta o la angiogénesis ovárica mediante estudios moleculares, probar hipótesis, identificar biomarcadores de fertilidad y esterilidad, y desarrollar estrategias más efectivas y nuevas terapias para diversas patologías, como son la preeclampsia o la azoospermia, entre otras⁴.

La investigación puede basarse en distintos escalones biológicos de estudio, desde el molecular al del propio organismo completo, pasando por el celular y el tisular, tanto *in vitro* como *in vivo*, pudiendo combinar ambos aspectos en un mismo modelo^{3,6}.

Uno de los modelos más comunes utilizados en reproducción asistida es el modelo animal⁷. En ellos se incluye el uso de ratones, ratas, cerdos o primates no humanos, con el fin de estudiar los procesos reproductivos en las condiciones deseadas. Son especialmente útiles para investigar la fisiología y patología reproductiva y estudiar el comportamiento animal asociado a reproducción, evaluar técnicas de fecundación *in vitro* (FIV), realizar estudios de desarrollo embrionario y analizar los efectos de diferentes tratamientos o intervenciones en la reproducción, integrando otros aspectos o modelos, como pueden ser celulares o moleculares^{5,7}, que veremos más adelante.

Supone una ventaja de los modelos animales su simplicidad; existen procedimientos a realizar de manera más sencilla que en el humano, implicando menos riesgos. Se pueden estudiar funciones fisiológicas aisladas al poder controlar las variables de estudio, y hay que tener en cuenta que los ciclos de vida y tiempos generacionales son de menor duración⁸. Pueden adaptarse y combinarse con cualquier otro experimento: cultivos *in vitro*, análisis moleculares en sangre, etc. La elección preferente del ratón como modelo experimental se debe a la utilización de los animales transgénicos, tanto *knock out* como *knock in*^{9,10}, según se silencien o introduzcan en los que uno o varios genes y, por ende, se detecte la pérdida o ganancia de función de la proteína de interés como consecuencia; así es como se consigue asociar funciones específicas a genes concretos. Todo ello se realiza gracias a la ingeniería genética⁹⁻¹¹. Cabe resaltar que el uso de la experimentación animal debe estar éticamente justificada, ya no sólo por ser una etapa previa a los ensayos clínicos en humanos, sino a que supone asumir una serie de riesgos, como a la hora de desarrollar a modo de emulación de enfermedades humanas, introducir mutaciones genéticas o pruebas de toxicidad, y que pueden causar graves daños en los animales⁸.

Otro de los modelos por excelencia en el campo de la investigación biomédica es el modelo celular, el cual resulta fundamental⁵. Aplicados a la reproducción humana asistida, se basan en el estudio *in vitro* de las células germinales, como los espermatozoides y los ovocitos^{6,12}, para comprender mejor su función, características y posibles alteraciones que podrían estar relacionadas con la infertilidad. Estas

investigaciones pueden incluir la evaluación de la calidad espermática, el análisis de la maduración ovocitaria, la manipulación genética o la modificación de condiciones de cultivo para mejorar la viabilidad y competencia de los gametos.

Gracias a estas investigaciones, de las cuales muchas incluyen estudios moleculares, se aborda la patogenia de las enfermedades más representativas en el ámbito de la reproducción. Un ejemplo de ello es, en el caso del envejecimiento de los ovocitos, la investigación sobre un factor clave, CDC26, el cual podría ser una diana terapéutica dado que se conoce que su deficiencia interrumpe el proceso de maduración de los ovocitos¹³. En relación con el envejecimiento, también cabe destacar, cómo afectan las terapias dirigidas mitocondriales y el estrés oxidativo al huso meiótico en la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos¹⁴.

Otra molécula de interés estudiada *in vitro* son los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son fragmentos de RNA no codificante monocatenario, de entre 18 y 24 nucleótidos; se unen a sitios específicos de RNA mensajero (mRNA) para inhibir su traducción o provocar su degradación. Un sólo miRNA puede tener efecto en distintos mRNA, así como un solo mRNA puede estar regulado por distintos miRNA¹⁵. Los miRNAs pueden ser biomarcadores moleculares no invasivos para clasificar la azoospermia según su origen, así como aportar datos sobre la reserva espermatogénica del testículo en estos pacientes, pudiendo ayudar a la elección de la técnica de reproducción asistida a usar; están presentes en las vesículas extracelulares del líquido seminal¹⁶⁻¹⁸. Estas pequeñas moléculas también intervienen en la comunicación del endometrio materno con el embrión previamente a la implantación, caracterizando la receptividad y el desarrollo de este proceso^{19,20}.

Además de los modelos animales y celulares, también se utilizan modelos tridimensionales, como los cultivos de tejidos y los organoides, que permiten simular el ambiente fisiológico y estudiar la interacción entre diferentes tipos de células involucradas en la reproducción²¹. Estos modelos más complejos proporcionan información detallada sobre la formación de órganos reproductivos, el desarrollo embrionario temprano y las interacciones entre el embrión y el útero materno²².

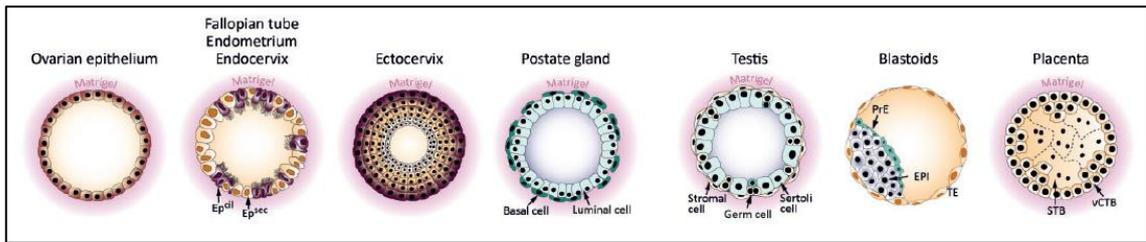


Figura 1. Estructuras organoides que modelan los tejidos reproductores fisiológicos femeninos y masculinos. Ep^{cil} , células epiteliales ciliadas del endocérvix; Ep^{sec} , células epiteliales secretoras del endocérvix; TE, trofoectodermo; EPI, epiblasto; PrE, endodermo primitivo; vCTB, citotrofoblastos vellosos; SCT, sincitiotrofoblastos²².

Los organoides son sistemas *in vitro* basados en células madre epiteliales tridimensionales, células madre pluripotentes o células progenitoras enriquecidas de fuentes primarias de tejido que se organizan por sí mismas espontáneamente, y que representan procesos moleculares y celulares clave importantes en humanos. Se enfocan en comprender procesos que controlan la diferenciación y función celular, permiten probar de manera preclínica tratamientos farmacológicos, dando lugar a una prometedora medicina personalizada²¹. Algunos modelos de organoides utilizados en reproducción humana asistida incluyen representaciones de la interacción materno-fetal^{20,21}; otros, se basan en células madre del ovario, trompa de Falopio, endometrio, glandulares endometriales, cuello uterino, glándula prostática, testículos, blastocisto y trofoblasto^{21,22}.

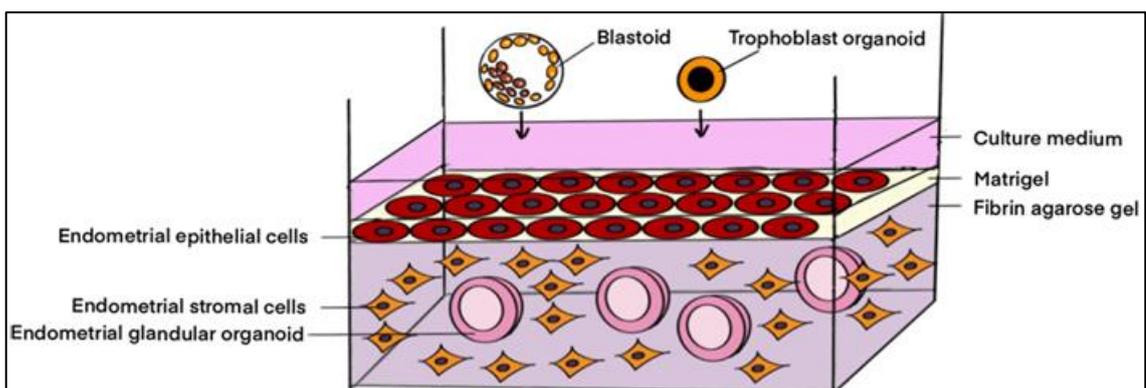


Figura 2. Ilustración de un modelo 3D según los estudios revisados para la investigación de la interacción trofoblasto-endometrio²¹.

El uso común de cultivos celulares con las características determinadas que se deseen es muy común, además de ser sencillo para aplicarlo a la investigación, lo que permite estudiar también embriones fecundados para medir las especies reactivas de oxígeno (ROS) y relacionarlo con la calidad embrionaria y la tasa de fecundación, funcionando como un marcador bioquímico²³.

En patologías como el síndrome de ovario poliquístico (SOP), se ha descubierto una importante asociación con la angiogénesis ovárica y la implicación de la misma en la enfermedad, por lo que llama la atención el estudio del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), dando sentido a la llegada de nutrientes al ovario, así como de moléculas de señalización, y, por ende, menor o mayor calidad ovocitaria²⁴.

En resumen, los modelos experimentales utilizados en reproducción asistida, ya sean animales, celulares o tridimensionales, desempeñan un papel fundamental en la investigación científica de la infertilidad y esterilidad. Estos modelos nos proporcionan conocimientos valiosos que pueden traducirse en avances clínicos y mejorar los resultados de los tratamientos de reproducción asistida.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal es realizar una revisión bibliográfica que recoja estudios actualizados de diversos modelos experimentales aplicados en base a distintas complicaciones reproductivas y muestre novedosas técnicas que pueden ser implementadas en investigación. Concretamente, se pretende, a través de breves recopilaciones de artículos científicos de la materia, evaluar cómo de cubierta está la necesidad investigadora en reproducción humana asistida basándose en la calidad de ajuste del modelo representativo de la patología.

3. MATERIALES Y MÉTODOS – ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE ESTUDIOS

Se realiza una búsqueda inicial muy general en PubMed, con los siguientes términos de búsqueda en inglés: “human reproduction”, “aging in human reproduction”, “infertility”, “Spain infertility”, “miRNAs”, “organoids in reproduction”, “cell culture model”, “extracellular vesicles”, y “assisted reproduction techniques”. En estas

búsquedas se utilizaban como criterios de inclusión elegir aquellos estudios que pertenecieran o combinaran principalmente los campos de reproducción humana asistida y modelos experimentales. Para ello se usaron operadores booleanos como “AND” y “NOT”, este último para excluir términos que eran recurrentes pero que no resultaban interesantes o de gran aportación.

Se consultaron repositorios y bases de datos de tesis doctorales, pero, aunque aportaban algunas ampliaciones sobre los términos ya buscados en PubMed, resultaban demasiado generalistas a la hora de aportar resultados exactos en la utilización del modelo experimental.

También se profundiza en la búsqueda bibliográfica a través de revistas especializadas en Reproducción Humana Asistida, dado que algunos artículos pertenecientes a estas revistas aparecían en las búsquedas realizadas en PubMed, pero otros se encontraron buscando específicamente en estas revistas: *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción*, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *Human Reproduction*, *Andrology*, *Reproductive BioMedicine Online Journal*, *Reproductive Biology and Endocrinology*, *Fertility and Sterility Journal*, y *Molecular Human Reproduction*.

Por último, se han consultado datos en Asociaciones y Sociedades Españolas y sus revistas como medios oficiales que avalan los datos expuestos, como, por ejemplo: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) y Sociedad Española de Fertilidad (SEF).

Se procura elegir aquellos artículos pertenecientes al año 2023, para que la revisión esté lo más actualizada posible, aunque en algunos casos se amplía al año 2021. Se ha incluido algún artículo más antiguo, como del año 1988, por las posibles descripciones técnicas y ampliación de los términos específicos del tema a desarrollar.

4. SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El ratón permite obtener varios estudios por animal de diversas variables de manera menos arriesgada que en el humano, además de poder adaptar las condiciones con mayores rangos que en los ensayos clínicos en humanos, siempre que no supongan un sufrimiento para el animal sin estar éticamente justificado. Al tener tiempos de generación y ciclos de vida menores, permite estudiar más cosas en menos tiempo⁸. El modelo animal, frente al humano, permite incorporar una herramienta que suscita mucha curiosidad, como es la ingeniería genética y modificación de los caracteres, donde en el humano no está permitido ni contemplado en la ley, pero sin embargo en los modelos animales sí se permite obtener distintas cepas en función de la característica de elección^{9,10}. En cuanto a la zona pelúcida, las diferencias en comparación del humano con el ratón son mayores que en otras especies animales: en el humano la zona pelúcida está formada por cuatro glicoproteínas mientras que en el ratón está formada por tres, siendo posible la existencia de diferencias en la fecundación. En las diferencias presentes entre especies se incluyen el número de crías o la anatomía del aparato reproductor. Respecto a la duración de la gestación, también es diferente, siendo más corta en el ratón. En el caso de los gametos masculinos, los espermatozoides, también se presentan diferencias, dado que los espermatozoides humanos son eyaculados y eso ya les aporta características de la membrana plasmática distintas, así como la existencia de diversas proteínas del líquido seminal que no existen en los ratones; los ovocitos de ratonas tienen contacto con el ambiente oviductal, al contrario que en el humano. En cuanto a los medios de cultivo utilizados en la investigación, existen algunos similares (iones, compuestos energéticos, vitaminas, antioxidantes, hormonas, factores de crecimiento, etc.), aunque algunas investigaciones hallan diferencias, seguramente por la seguridad toxicológica o la pureza en los de investigación humana clínica, mientras que en el caso de los animales se suelen preparar en el mismo laboratorio de reproducción¹¹.

En el caso de los estudios moleculares combinados con modelos animales para la investigación del envejecimiento materno en la reproducción (envejecimiento de ovocitos), se vio que, en el caso de CD26, a través de inmunohistoquímica, secuenciación de ARN (RNA-seq) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (q-PCR) se estudia la expresión génica diferencial en ovocitos humanos frente a ovocitos de ratona *knock out*, viendo que en ovocitos jóvenes la expresión era distinta

a la de ovocitos de mayor edad (dependiendo de la edad de la paciente), resultando que en estos últimos los niveles de mRNA y CDC26 se encontraban disminuidos en comparación con pacientes jóvenes. Los defectos pueden solventarse parcialmente por la sobreexpresión de la proteína CD26¹³. En el caso de los estudios mitocondriales, combinando el uso de ovocitos inmaduros (vesículas germinales) de ratón y humanos, midiendo el potencial de membrana mitocondrial, las ROS mitocondriales, y observando la alineación de los cromosomas en meiosis en el tratamiento de estos ovocitos con MitoQ o BGP-15 en la MIV, se evidenció una protección contra los defectos del huso y de los cromosomas en ovocitos envejecidos murinos y a aquellos expuestos a estrés oxidativo; en los humanos, el tratamiento con MitoQ durante la MIV promovió la maduración nuclear y tuvo un efecto positivo similar al anterior¹⁴.

Para el estudio de los miRNAs en azoospermia, se determinó el patrón de expresión de microARNs de vesículas extracelulares, y que interactúan con ARN de transferencia, en individuos normozoospermicos y azoospermicos (de tipo anatómico o secretor) mediante retrotranscripción (RT) inversa y q-PCR en tiempo real (RT-q-PCR). Destacan las isoformas de miRNAs (isomiR), pero también otras variantes de isomiRs, por diferencias en el plegamiento^{16,17}. Se ha visto que en distintos tipos de azoospermia (obstructiva, que conserva espermatogénesis y la causada por falta de espermatogénesis) se muestra una expresión diferencial de miRNAs, y se ha encontrado que miR-31-5p (presente en exosomas) es un biomarcador específico y sensible para la azoospermia (>90%), lo que da mejor resultado incluyendo valores de la hormona folículo estimulante (FSH) en sangre¹⁸.

Dentro del empleo de los organoides como modelo de investigación, la mejor opción resulta ser la combinación integral de modelos endometriales con blastoides o trofoblastos, representando de forma más precisa los mecanismos fisiológicos que tienen lugar en la gestación²¹. Esto aún puede mejorar incluyendo las células estromales y glandulares endometriales al sistema, de manera que se mantenga la respuesta hormonal y la función secretora, simulando el endometrio; y siendo los blastoides u organoides de trofoblasto los equivalentes al blastocisto y las vellosidades placentarias. También pueden incorporarse células endoteliales e inmunológicas. Los organoides mantienen sus características genéticas durante más de seis meses de cultivo, su viabilidad al incluirlos en un modelo tridimensional sería impredecible; es por ello que la funcionalidad de este tipo de modelos de cultivo aún es desconocida.

Estos resultados se intentan abordar con la aplicación de microfluidos en el modelo, donde se pueden controlar más parámetros²⁵.

Para establecer si los ROS son un buen marcador, se midieron los niveles de ROS de cada plato de cultivo de embriones mediante un ensayo de quimioluminiscencia y se vio que los niveles altos de ROS en el día 1 en el medio de cultivo se asociaron con una baja tasa de blastocistos, baja tasa de fertilización, baja tasa de segmentación y alta fragmentación embrionaria en ciclos de microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), pero no en FIV convencional, sin embargo en el caso de tasa de embarazo, esta se ve disminuida tanto en ciclos de FIV como de ICSI²³.

Respecto a la implicación del VEGF, éste promueve la proliferación y migración de células endoteliales y la permeabilidad vascular. De manera diferencial, el líquido folicular de las mujeres con SOP tiene menores niveles de metabolitos de estrógenos proangiogénicos (ME) y VEGF en comparación con el de las mujeres fértiles con ciclos regulares²⁴.

5. DISCUSIÓN

El ratón puede no ser del todo una buena elección en todos los casos para el estudio de ciertas características humanas en los que se quiere investigar, como por ejemplo las diferencias que se encuentran en la composición molecular de la zona pelúcida, no pudiendo estudiar con exactitud los mecanismos moleculares que intervienen en la fecundación. Debido a las diferencias en el líquido seminal entre especies, hay proteínas no presentes en los ratones que, para lograr una buena adaptación del modelo a la representación humana, deberían ser aportadas a través de medios de cultivo. Estas diferencias parecen alejar al ratón de ser un modelo de estudio ideal para las enfermedades reproductivas humanas, así como para estudios moleculares, ya que implicaría tener que utilizar medios de cultivo también distintos¹¹. Aunque puede pensarse que el ratón no se corresponde a una buena representación del aparato reproductor humano, cabe destacar que el uso del mismo se debe a la ventaja que supone el que pueda albergar numerosos fetos tras una ovulación fecundando los ovocitos correspondientes, aumentando el número de posibles fetos susceptibles de estudio frente a otras especies que generan un solo feto en cada gestación⁹⁻¹¹.

CDC26 puede representar un enfoque terapéutico novedoso contra las anomalías del huso y cromosómicas relacionadas con el envejecimiento materno. Esta carencia de CD26 hace a los ovocitos más propensos a la aneuploidía, por lo que se vio que al aumentar la expresión de esta molécula estos efectos negativos no se daban¹³. También pudo influir el estado de degradación o características del ovocito descartado. Se observa cierta mejora en el tratamiento de los ovocitos con MitoQ y BGP-15, pero hay que tener en cuenta que los ovocitos pueden tener distinta edad y son ligeramente distintos los medios en los que se tratan, aunque sí es notable que la presencia de estas moléculas genera efectos positivos y antioxidantes a los ovocitos ligeramente estropeados en cultivo¹⁴.

Al esperar un gran número de isoformas de miRNAs en el análisis de la expresión para la azoospermia, se considera que es necesario incluir en el estudio más variedades de miRNAs que pudieran interferir o aportar nuevas líneas de estudio en este campo¹⁶⁻¹⁸. Estudiar cambios más específicos en la expresión de isoformas de ARN no codificantes en pequeñas vesículas extracelulares o exosomas del semen, en el caso de individuos azoospermicos, podría ser útil para seleccionar biomarcadores adicionales no invasivos con fines diagnósticos^{16,17}. Hemos visto que los miRNA se pueden analizar, sobre todo, en vesículas extracelulares o exosomas, tanto para casos de pacientes masculinos (recuento de espermatozoides por diversas causas) o para pacientes femeninas (embarazo, receptividad endometrial) por lo que se puede intentar ampliar esta aplicación de los miRNAs como diagnóstico precoz no invasivo en otros tipos de biopsias (tisulares, miRNAs libres en biopsias líquidas, etc.) y que también pudieran tener una aplicación directa en enfermedades reproductivas, como en riesgos derivados de la concepción (patologías vasculares y otras relacionadas)^{19,20}.

En el caso de los organoides, se sabe que, aunque están en etapas iniciales de aplicación, tienen la capacidad de imitar o representar de forma potencial los modelos de implantación. Se ha visto que se obtienen mejores resultados y más realistas con la combinación de distintas células funcionales; estas células pueden provenir de pacientes de interés para modelar distintas patologías^{21,22}. Algunas condiciones hacen que estos modelos sean algo inestables, siendo difícil predecir su viabilidad. Resulta importante conocer los parámetros que se establecen en un cultivo celular tridimensional, dado que intervienen muchas variables, para poder introducir y

estudiar las características deseadas²⁵. En el caso de un buen ajuste, esto supondría una fiel representación del funcionamiento reproductor en el modelo deseado.

Hay que tener en cuenta, que los niveles de ROS, tienen un efecto en las tasas de crecimiento de los embriones obtenidos tanto a través de FIV convencional como de ICSI, aunque en algunos casos sí que se evidencian mejores tasas en FIV a pesar de estar presente el estrés oxidativo, lo que puede atribuirse en combinación al estrés al que se somete al ovocito y por ende al embrión resultante, el cual es algo más pronunciado en aquellos embriones obtenidos por ICSI, existiendo una mayor manipulación de los gametos²³.

En el caso de los menores niveles de VEGF, característico de mujeres con SOP, llevaría a la detención del desarrollo folicular que conduce a la anovulación crónica, asociado con niveles plasmáticos elevados de hormona luteinizante (LH), andrógenos y hormona antimülleriana (AMH)²⁴.

6. CONCLUSIONES

La revisión bibliográfica realizada recoge estudios actualizados y muy novedosos de diversos modelos experimentales aplicados a distintas patologías de la reproducción humana, teniendo todos ellos una aplicación actual o en un futuro cercano a la investigación, pudiéndose ampliar a la clínica de resultar exitoso.

La necesidad investigadora de representar un modelo cercano al humano está cubierta aunque es perfeccionable. Se requiere una combinación de enfoques experimentales y clínicos para obtener una comprensión completa de las patologías reproductivas y desarrollar tratamientos efectivos.

En este sentido, es importante consultar con los especialistas e investigadores de la materia la opción más adecuada en cada caso, ya que cada situación de infertilidad es única y requiere un enfoque individualizado.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Jain V, Chuva de Sousa Lopes SM, Benotmane MA, Verratti V, Mitchell RT, Stukenborg J-B. Human development and reproduction in space-a European perspective. *NPJ Microgravity* [Internet]. 2023;9(1):24. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41526-023-00272-5>
2. Torrades S. Aspectos legales y éticos de las técnicas de reproducción asistida. *Offarm* [Internet]. 2003 [cited 2023 Jun 27];22(5):118–24. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-aspectos-legales-eticos-tecnicas-reproduccion-13047752>
3. Tesarik J, Mendoza-Tesarik R. Molecular clues to understanding causes of human-assisted reproduction treatment failures and possible treatment options. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022;23(18):10357. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms231810357>
4. Viera-Molina M, Guerra-Martín MD. Analysis of the effectiveness of assisted reproduction techniques: An Sist Sanit Navar [Internet]. 2018;41(1):107–16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.23938/assn.0254>
5. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, et al. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* [Internet]. 2017;53(8):669–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>
6. Segeritz C-P, Vallier L. Cell Culture. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier; 2017. p. 151–72. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
7. Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2007;8(1):58–69. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2025>

8. Rodríguez Yunta E. Desafíos éticos de la manipulación genética y la investigación con animales. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2012;29(4):535–40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/s1726-46342012000400018>
9. Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. Nature [Internet]. 1988;336(6197):348–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/336348a0>
10. Frohman MA, Martin GR. Cut, paste, and save: new approaches to altering specific genes in mice. Cell [Internet]. 1989;56(2):145–7. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90887-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(89)90887-8)
11. Coy P. Medios de cultivo para fecundación in vitro: ¿Qué les falta para ser perfectos? Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(1):44-52.
12. Fasano G, Demeestere I, Englert Y. In-vitro maturation of human oocytes: before or after vitrification? J Assist Reprod Genet [Internet]. 2012;29(6):507–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-012-9751-9>
13. Li L, Xia Y, Yang Y, Zhang W, Yan H, Yin P, et al. CDC26 is a key factor in human oocyte aging. Hum Reprod [Internet]. 2021;36(12):3095–107. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deab217>
14. Al-Zubaidi U, Adhikari D, Cinar O, Zhang Q-H, Yuen WS, Murphy MP, et al. Mitochondria-targeted therapeutics, MitoQ and BGP-15, reverse aging-associated meiotic spindle defects in mouse and human oocytes. Hum Reprod [Internet]. 2021;36(3):771–84. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deaa300>

15. Rangrez AY, Massy ZA, Metzinger-Le Meuth V, Metzinger L. miR-143 and miR-145: molecular keys to switch the phenotype of vascular smooth muscle cells: Molecular keys to switch the phenotype of vascular smooth muscle cells. *Circ Cardiovasc Genet* [Internet]. 2011;4(2):197–205. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.958702>
16. Larriba S, Sánchez-Herrero JF, Pluvinet R, López-Rodrigo O, Bassas L, Sumoy L. Seminal extracellular vesicle sncRNA sequencing reveals altered miRNA/isomiR profiles as sperm retrieval biomarkers for azoospermia. *Andrology* [Internet]. 2023; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/andr.13461>
17. Larriba S, Vigués F, Bassas L. Using small non-coding RNAs in extracellular vesicles of semen as biomarkers of male reproductive system health: Opportunities and challenges. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(6). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24065447>
18. Barceló M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Hum Reprod* [Internet]. 2018;33(6):1087–98. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dey072>
19. Juárez-Barber E, Segura-Benítez M, Carbajo-García MC, Bas-Rivas A, Faus A, Vidal C, et al. Extracellular vesicles secreted by adenomyosis endometrial organoids contain miRNAs involved in embryo implantation and pregnancy. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2023;46(3):470–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.12.008>
20. Segura-Benítez M, Bas-Rivas A, Juárez-Barber E, Carbajo-Garcia MC, Faus A, Pellicer A, et al. Human blastocysts uptake extracellular vesicles secreted by

- primary endometrial epithelial cells containing mirnas related to implantation and early embryo development. *Fertil Steril* [Internet]. 2022;118(4):e73–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.08.226>
21. Li X, Kodithuwakku SP, Chan RWS, Yeung WSB, Yao Y, Ng EHY, et al. Three-dimensional culture models of human endometrium for studying trophoblast-endometrium interaction during implantation. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2022;20(1):120. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12958-022-00973-8>
 22. Haider S, Beristain AG. Human organoid systems in modeling reproductive tissue development, function, and disease. *Hum Reprod* [Internet]. 2023; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dead085>
 23. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AAN, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril* [Internet]. 2004;82(3):593–600. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.121>
 24. Vaca-Merino VH, Vaca-Sarango CI, Vaca-Sarango DD. Angiogénesis e infertilidad en el síndrome de ovario poliquístico y su expresión en el gen factor de crecimiento endotelial vascular. *Pro Sciences: Revista De Producción, Ciencias E Investigación*. 2022;6(44),196-205. <https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol6iss44.2022pp196-205>
 25. Wang H, Pilla F, Anderson S, Martínez-Escribano S, Herrer I, Moreno-Moya JM, et al. A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2012;18(1):33–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gar064>