

TÉCNICAS DEL FUTURO: INGENIERÍA DE TEJIDOS Y USO DE CÉLULAS MADRE EN MEDICINA REPRODUCTIVA

FUTURE'S TECHNOLOGY: TISSUE ENGINEERING AND STEM CELLS IN REPRODUCTIVE MEDICINE

DRA. CECILIA FABRES V. (1)

1. UNIDAD DE MEDICINA REPRODUCTIVA. DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA. CLÍNICA LAS CONDES. cfabres@clc.cl

RESUMEN

Últimamente ha cobrado gran interés en la comunidad médica y científica, el avance experimentado por la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos y el uso de terapias celulares en base a células autólogas maduras, como también el uso de células madre. Desde que se levantó en Estados Unidos, la prohibición de investigar con células madre embrionarias, se ha producido un aumento de las investigaciones en este campo. El interés por estas investigaciones, se ha traspasado a la comunidad no científica, que se encuentra expectante frente al progreso que se logre, con las terapias derivadas de tales estudios. En medicina reproductiva, existe la esperanza de poder producir células germinales tanto femeninas (ovocitos o sus precursores y espermatozoides o sus precursores), a partir de células madre, para tratar pacientes con falla gonadal (ovárica o testicular), que hasta ahora resuelven su problema de infertilidad, mediante el uso de gametos donados, prevaleciendo la falla endocrina, que se resuelve con la administración de reemplazo hormonal. Las células madre son células indiferenciadas, totipotenciales que bajo ciertas condiciones, pueden diferenciarse a células especializadas. La medicina regenerativa se vale de la ingeniería de tejidos y las terapias celulares con células autólogas maduras y también con células madre. Este artículo es una revisión bibliográfica sobre las últimas investigaciones en el campo de la medicina regenerativa y el uso de células madre en medicina reproductiva. Se describen los diferentes tipos de células madre y los tejidos que se ha logrado reproducir in vitro hasta ahora, como también algunos estudios en animales y su aplicación en humanos.

Palabras clave: Ingeniería de tejidos, medicina regenerativa en células madres, foliculogénesis, falla testicular, falla ovárica, reserva ovárica.

SUMMARY

In the last years, the scientific and non-scientific community have been motivated by the great advances in the field of regenerative medicine, tissue engineering and cell therapies (using either mature autologous cells or stem cells). Since the beginning of 2009, once the prohibition of research in embryonic stem cells was abolished, there has been an increase in research in this field. There is great expectation, specially in the field of reproductive medicine and infertility where there exists the hope to produce germinal cells (oocytes and sperms) to treat couples with gonadal failure (ovarian or testicular). In these patients, gamete donation and permanent hormonal replacement therapy have resolved their fertility and/or endocrine problems. Regenerative medicine uses tissue engineering, and cell therapies to repair the function of a damaged organ. Stem cells are undifferentiated, totipotentially cells, that under certain conditions or milieu may differentiate to specialized cells. This article is a bibliographic review of the most recent investigations in the field of regenerative medicine and stem cell therapies, using animal models and their application to humans.

Keywords: Tissue engineering, regenerative medicine, stem cells, folliculogenesis, testicular failure, ovarian failure, ovarian reserve.

INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos utiliza los principios que rigen el trasplante de células, las ciencias aplicadas y la ingeniería, todo ello orientado hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que permitan restablecer o mantener la función normal de un órgano o tejido. Así, por ejemplo, se encarga de desarrollar biomateriales, como una matriz de soporte extracelular artificial, que reemplace a la natural y provea un espacio tridimensional, para que las células puedan formar el nuevo tejido con su apropiada estructura y función. La matriz debe proveer las condiciones y el ambiente para que pueda ocurrir una adecuada regulación celular (adhesión, migración, proliferación y diferenciación), así como la adecuada entrega de factores bioactivos (de crecimiento y adhesión).

MATRICES EXTRACELULARES DE SOPORTE

Se puede utilizar matrices acelulares y matrices con células. Las matrices acelulares se preparan removiendo mecánicamente las células de un tejido rico en colágeno, pero también las existen, de tejidos acelulares: submucosa intestinal y vesical (1). Tienden a degradarse lentamente luego de ser implantadas y son reemplazadas por proteínas de la matriz extracelular, secretadas por las células del tejido en regeneración.

Según su tipo, las matrices pueden ser naturales, como colágeno o alginato; polímeros sintéticos, como el ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poliláctico (PLA) o una mezcla de ambos (PGLA).

TERAPIAS CELULARES

Las terapias celulares se realizan con células o tejidos adultos diferenciados. La fuente de tejido a usar (donado) puede ser heteróloga (otra especie), halogénica (misma especie, otro individuo) o autóloga (mismo individuo). El ideal es usar células autólogas, ya que con ello se evita el rechazo y el uso de inmunosupresores. Para ello se toma una biopsia al propio huésped en la parte sana del órgano o tejido afectado, las células se disocian y pueden implantarse directamente en el huésped, o bien, pueden expandirse en cultivo, unidas a una matriz de soporte, para luego ser implantadas al huésped.

Principales limitaciones al uso de terapias celulares han sido: la dificultad para tomar una muestra de tamaño adecuado en un órgano que está en fase terminal de su función y las dificultades para multiplicar o amplificar *in vitro* células específicas en gran cantidad. Incluso, hay órganos, como el páncreas, en que no se ha logrado expandir células autólogas primarias (1).

Sin embargo, investigadores en diferentes partes del mundo, han logrado desarrollar en el laboratorio diferentes tipos de células y tejidos, realizando estudios en animales, para su posterior aplicación clínica en humanos. Por ejemplo, se han construido injertos vasculares, usando células autólogas y un soporte biodegradable, que puede degradarse *in vivo*, permitiendo que el nuevo tejido que se forma, vaya progresando, sin que queden trazas de un material extraño o ajeno al organismo. Esta

técnica se aplicó con éxito en perros (2) y en ovejas (3). Posteriormente, la técnica fue aplicada en humanos. Se recuperaron células vasculares autólogas, que luego se sembraron y expandieron en el soporte biodegradable, el tejido resultante fue aplicado para reemplazar una arteria pulmonar estenosada, que se había intentado corregir previamente con cirugía, sin éxito. El tratamiento fue exitoso y siete meses después del implante de tejido, no se encontró evidencia de oclusión o formación de aneurisma en el paciente receptor del injerto (4).

Otro ejemplo de terapia celular ha sido el uso de cartílago autólogo. Tomando una biopsia de cartílago del lóbulo de la oreja, se logra fácilmente la formación de neocartílago *in vivo* e *in vitro*. Los condrocitos se cultivan en polímeros sintéticos, biodegradables. Esta técnica se adaptó a un modelo porcino, para tratar el reflujo vesico ureteral. Se sembraron células de cartílago, en una matriz de alginato, que va siendo reemplazada por la matriz producida por el cartílago, a medida que el alginato se biodegrada. Luego esta solución fue inyectada por vía cistoscópica y se vio que el cartílago elástico que se formó, podía corregir el reflujo vesicoureteral, sin evidencias de obstrucción (5). Esta tecnología fue posteriormente aplicada en humanos, en dos estudios multicéntricos, realizados en 10 centros en EE.UU., con buenos resultados (6). En otro estudio similar, realizado en tres centros médicos también en EE.UU., se trató un grupo de pacientes con incontinencia urinaria, inyectando condrocitos autólogos endoscópicamente. Los estudios fase 1 mostraron una tasa de éxito de aproximadamente 80% a los tres y doce meses post inyección (7).

Se sabe que los hombres con falla testicular o hipogonadismo, además de infértiles, son dependientes de terapias de reemplazo con andrógenos para poder mantener niveles fisiológicos de testosterona y sus metabolitos. Las modalidades disponibles para reemplazo hormonal (tabletas y cápsulas, inyecciones de depósito, parches y gel transdérmico) se asocian a grandes fluctuaciones en los niveles séricos y a efectos adversos, como retención de líquido y nitrógeno, hipertensión y cambios en la densidad mineral ósea. En un estudio en ratas macho castradas, se intentó reemplazar la producción hormonal de andrógenos usando implantes de células de Leydig o fragmentos de tejido gonadal heterólogo. Sin embargo, los resultados no fueron buenos. A pesar que el tejido transplantado sobrevivió, falló en la producción de andrógenos (8).

La encapsulación de células en membranas biopoliméricas y biocompatibles ha mostrado ser una técnica efectiva para proteger a las células transplantadas de la respuesta inmune del huésped, manteniendo su viabilidad, mientras se permite la liberación de los agentes terapéuticos deseados. Así, en otro estudio, realizado en ratas macho castradas, se usó células de Leydig encapsuladas en microesferas de alginato-poli-L-lysina, como método de liberación de testosterona *in vivo*, observándose niveles elevados y estables de testosterona sérica. Esto sugiere que la encapsulación de células de Leydig podría constituir una modalidad terapéutica para la sustitución de testosterona en humanos (9, 10).

Existe una variedad de condiciones patológicas del pene, como traumas, cáncer del pene, disfunción eréctil severa, genitales ambiguos, hipospa-

días y epispadias, que requieren cirugía reconstructiva. Una limitación importante, es la escasez de tejido para la reconstrucción. Por esto, el uso de células autólogas del huésped es una buena opción. Se realizó un estudio, en el cual se extrajo músculo liso cavernoso autólogo y células endoteliales, se amplificaron y se sembraron en matrices de colágeno acelulares, para ser luego implantadas en un modelo de conejo. Estudios histológicos posteriores confirmaron la adecuada organización de los tejidos penianos. Esto también fue confirmado con estudios funcionales como cavernosonografía, cavernosometría y estudios de apareamiento (11).

Las malformaciones uterinas tienen también grandes implicancias clínicas. Es así como pacientes con desórdenes intersexuales o con una cloaca única, no tienen suficiente tejido uterino para efectuar una adecuada reparación y tener un embarazo posterior. Por ello se investigó la posibilidad de construir tejido uterino a partir de células autólogas. Utilizando un modelo de conejo, se obtuvo células musculares lisas del útero y células endoteliales, se hicieron crecer y expandir en cultivo, luego fueron sembradas en un soporte preconfigurado de polímero biodegradable con forma de útero. Esta matriz se usó para el reemplazo subtotal del útero en el mismo animal. Seis meses después del implante, estudios histológicos e histoquímicos mostraron tejido uterino con componentes normales. También se demostró, con estudios biomecánicos, que el tejido uterino formado era funcionalmente idéntico al tejido uterino normal (12).

TERAPIA CON CÉLULAS MADRE

Debido a las limitaciones, de las terapias celulares con células diferenciadas autólogas, como se mencionó anteriormente, se ha planteado usar células precursoras indiferenciadas o células madre. La combinación de las técnicas aprendidas en las últimas décadas en la ingeniería de tejidos, con esta fuente potencialmente inagotable de células tan versátiles, puede llevar a nuevas fuentes para el reemplazo de órganos y tejidos. En los últimos años se han desarrollado varios protocolos que permiten identificar y aislar en humanos células indiferenciadas primitivas (células madre) en diferentes tejidos, lográndose su multiplicación *in vitro*, como también proveer las condiciones que llevan a su diferenciación, haciendo posible la aplicación clínica de células madre autólogas (1).

Las células madre son células primitivas, indiferenciadas y totipotenciales, capaces de diferenciarse a células especializadas para formar diferentes tejidos en el organismo.

Hay dos clases de células madre, según su origen:

- Embriónicas, que se encuentran en el macizo celular interno del blastocisto, del cual se pueden obtener por su disección mecánica o inmunológica. Tienen dos propiedades importantes: pueden proliferar en un estado indiferenciado, reproduciéndose a sí mismas en cultivo en forma ilimitada (inmortales) y pueden diferenciarse. Son pluripotenciales, es decir, pueden originar células que se diferenciarán a cualquiera de las tres capas embrionarias: endo, ecto y mesodermo (13).
- Adultas o somáticas, que se encuentran en diferentes cantidades en

casi todos los tejidos con capacidad de regenerarse, especialmente, en la médula ósea, tejido graso y tejido conjuntivo. Son multipotenciales, o sea son capaces de dar origen a células especializadas de su misma línea embrionaria.

Experimentalmente se puede producir células madre de origen embrionario mediante las siguientes técnicas:

- La clonación terapéutica, llamada también transferencia o trasplante nuclear, que consiste en la transferencia del núcleo de una célula somática de un donante determinado a un ovocito enucleado, para generar un embrión genéticamente idéntico al donante. Pueden usarse las células embrionarias obtenidas de esta forma, en el tratamiento de enfermedades renales terminales, enfermedades neurodegenerativas o diabetes, en el donante, sin provocar rechazo. Es muy difícil obtener trasplantes inmunocompatibles de dichos órganos o tejidos (14).
- La activación partenogenética de ovocitos no fecundados. Cibelli y colaboradores (15) demostraron en monas (*macaca fascicularis*) que células indiferenciadas pluripotentes (células madre) obtenidas de ovocitos en metafase II (M II), activados partenogenéticamente, tenían una amplia capacidad de diferenciación. En su estudio, 28 de 77 ovocitos maduraron *in vitro* hasta el estadio M II. Los ovocitos M II fueron activados partenogenéticamente y un 14% de ellos logró desarrollarse a blastocisto, el maciso celular interno fue aislado y se obtuvo células embrionarias indiferenciadas que fueron cultivadas *in vitro*.

NUEVOS CONCEPTOS ACERCA DE LA FOLICULOGÉNESIS

Durante los últimos 40 años, ha existido el dogma que en las mujeres, como en algunos mamíferos, se pierde la capacidad de generar nuevos ovocitos, desde cierto momento de su desarrollo fetal en que se logra una cantidad fija de folículos en los ovarios desde antes de nacer (16, 17). Esta cantidad fija de folículos al nacer, se estima en aproximadamente un millón 300.000 en la especie humana, pudiendo haber pequeñas variaciones de una mujer a otra (18). Durante toda la vida de la mujer, se produciría, en ambos ovarios, un proceso de crecimiento folicular y atresia o muerte celular programada (19). A la edad de la menarquia, se estima que quedaría una cantidad cercana a los 300.000-400.000 folículos y durante toda su vida, una mujer ovularía solo alrededor de 250 ovocitos (18). De modo que, en una mujer con ciclos ovulatorios regulares, en cada ciclo se iniciaría el crecimiento de una cohorte de aproximadamente 12 a 18 folículos, de los cuales solo uno será seleccionado para ser ovulado. Esta rigurosa selección se produce por señales hormonales y de retroalimentación entre el ovario y la hipófisis. El resto de la cohorte sufriría atresia y nunca más serían utilizados. De esta forma, se iría extinguiendo en el ovario ese capital de folículos con que una mujer nace, a medida que avanza la edad, hasta llegar a la menopausia (20). El proceso de desarrollo y atresia, o muerte celular programada, se produciría en los ovarios durante toda la vida de la mujer: en las niñas desde antes de la menarquia y en la mujer adulta, aún durante el embarazo y la lactancia. La menopausia no es otra cosa que el agotamiento de los folículos en el ovario, con la consecuente falta de producción de estrógeno y cese de las menstruaciones, que se produce en la mujer alrededor de los 49 ± 5 años. Sin embargo,

diferentes situaciones o patologías, como cirugías muy extensas sobre los ovarios, tiroiditis autoinmunes o uso de drogas para tratamientos de cáncer, pueden provocar una menopausia precoz (antes de los 40 años). Pero existe también, un grupo creciente de mujeres, que sin presentar ninguno de los antecedentes mencionados, experimenta una menopausia precoz o una disminución importante de su reserva ovárica, de causa idiopática o indeterminada, bastante antes de los 40 años. Este último grupo de mujeres, tiene una disminución objetiva en su fertilidad (se embarazan menos y abortan más), por tener una peor calidad de ovocitos (21), por lo que muchas de ellas deben recurrir a la donación de ovocitos para poder ser madres.

Esta problemática se ha manifestado más comúnmente en los últimos años, debido a cambios sociológicos a nivel mundial, de los que Chile no está exento. En efecto, actualmente hay una postergación en la edad del matrimonio y en la edad en que las mujeres quieren tener su primer hijo (22).

En los últimos años han surgido estudios que desafían y contradicen el dogma aceptado hasta ahora, del número fijo de folículos antes de nacer, y demuestran su formación de novo en el ovario juvenil y adulto. Se ha demostrado que esto ocurre en roedores (23) y en humanos, a partir de células madre indiferenciadas presentes en el ovario (24, 25).

Estudios en ratones, han mostrado que en esta especie al igual que en humanos, también se produce una declinación del número de ovocitos después del nacimiento (26). Sin embargo, un estudio reciente, cuestiona el dogma de un número predeterminado de folículos y ovocitos, al demostrar formación de ovocitos (oogénesis), con su respectiva cobertura de células somáticas (foliculogénesis), en forma persistente en los ovarios de ratones hembra durante su vida juvenil y adulta (23). Este concepto se ha tratado de demostrar en otras especies de mamíferos, pero aún no hay suficiente evidencia y se está abriendo camino lentamente (27).

En otro estudio, Johnson et al. (25) demostró que los ovarios de hembras adultas de ratones pueden producir cientos de ovocitos nuevos en 24 horas, reforzando los hallazgos de su estudio inicial. Sus experimentos en ratones hembras, basados en análisis de expresión génica y trasplante de médula ósea, sugieren que la médula ósea es una posible fuente de células madre, capaces de transformarse en células germinales (25). Se realizaron estudios adicionales en hembras de la misma especie esterilizadas por quimioterapia, a las que se transplantó sangre periférica, obtenida de otras hembras transgénicas que tenían restringida su línea germinal a la expresión de una proteína fluorescente verde y se demostró la presencia de ovocitos con tinción para la proteína fluorescente verde, en la superficie ovárica de las hembras transplantadas. Lo que sugiere que dichas células germinales provendrían de células progenitoras de la médula ósea alogénica, que viajarían por la circulación periférica al ovario. Sin embargo, no se ha demostrado que estas células sean capaces de producir ovocitos fertilizables y crías viables. Bukovsky et al. (24) sostiene, a diferencia de lo que concluye Johnson, que las células germinales de hembras adultas serían de origen epite-

lial de la superficie ovárica y algunas de ellas, al entrar a la circulación periférica, llegarían a poblar la médula ósea. El propuso un estudio en animales, comparando el efecto de transfusiones autólogas versus alogénicas de concentrados de células sanguíneas blancas nucleadas, para inducir renovación folicular después de quimioterapia. Este autor sugiere que los ovarios de roedores poseen acúmulos de células granulosa primitivas, similar a los ovarios humanos, y para que éstos sean recolonizados, con nuevos folículos primarios, se requeriría la presencia de dichos nidos, para que alojaran a los nuevos ovocitos, que se formen en la superficie del ovario (24).

En un estudio realizado en ovarios humanos, obtenidos de mujeres jóvenes con ciclos regulares sometidas a histerectomía por dolor pelviano, Bukovsky et. al. (28) demostró que en ellos se encuentran los componentes para la formación de nuevos folículos primarios. Las células de la granulosa primitivas y las células germinales se diferenciarían secuencialmente y de novo a partir de células mesenquimáticas progenitoras citoqueratina positivas, que residen en la túnica albugínea. Los folículos primarios se formarían de la unión o ensamblaje de ovocitos (células germinales) con nidos de células de la granulosa primitiva, que se encuentran en la corteza ovárica. Al contrario que en la gónada masculina, en el ovario no se encuentran células madre de la línea germinal. Entonces, el número de nuevos folículos primarios, en los ovarios de mujeres adultas estaría determinado por el número de nidos de células de la granulosa primitivas y por el número de ovocitos disponibles. Por lo tanto, durante la vida reproductiva de la mujer, el "pool" de folículos primarios no sería una población estática, sino dinámica, de estructuras que se diferencian, mientras otras regresan. Esto podría representar, un proceso de eliminación de folículos cromosómicamente dañados, o alterados por un daño ambiental, de manera espontánea.

POTENCIALES APLICACIONES CLÍNICAS DE LA TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS MADRE

En humanos hay evidencia de que luego del trasplante de células madre de médula ósea a mujeres con falla ovárica secundaria a quimioterapia por cáncer (linfoma y leucemia) se logra recuperar, al menos, de manera transitoria, su función ovárica. Se han descrito por lo menos 4 casos de pacientes con falla ovárica demostrada (FSH > 35 mUI/ml), que requirieron terapia de reemplazo hormonal y luego de un trasplante de células madre recuperaron sus ciclos y tuvieron un embarazo con niño sano (29).

Por muchos años, se han realizado en la especie humana, terapias celulares con células madre obtenidas de adulto, en enfermedades como leucemias y linfomas, con resultados bastante exitosos, mediante trasplantes de médula ósea. Está ampliamente demostrado que células madres obtenidas de médula ósea, y aún de sangre periférica, son capaces de diferenciarse hacia todas las líneas de células sanguíneas y aún a otras células de la misma línea embrionaria (mesodermo).

Investigaciones recientes han mostrado la posibilidad de diferenciación

de células madre, tanto embrionarias como adultas, a muchas líneas celulares (miocardio, piel, páncreas, tejido nervioso y otros), lo que promete grandes avances en el tratamiento de enfermedades secundarias a la insuficiencia o falla localizada de un órgano en particular (infarto al miocardio, grandes quemaduras, diabetes y sección de la médula espinal).

Es posible que en un futuro cercano la falla ovárica precoz, así como la falla testicular puedan tratarse mediante la generación de células germinales a partir de células madre obtenidas de tejido graso, piel o médula ósea del propio huésped, las que posteriormente serían incorporadas o implantadas en el ovario o testículo, de modo que reanuden su funcionamiento. En Junio 2009 apareció un artículo preliminar en la revista *Stem Cells & Development* que mostraba desarrollo de espermios humanos a partir de células madre embrionarias, sin embargo, dicho artículo fue retirado por los editores por lo que no existen conclusiones definitivas al respecto. Como se mencionó anteriormente, tanto en la falla ovárica como testicular un aspecto importante es el reproductivo pero el otro, no menos importante, es una mantención adecuada de los niveles de hormonas sexuales requeridos para el normal funcionamiento del organismo. Si la generación de células germinales a partir de células madre fuera posible, se resolverían ambos aspectos. Hoy la carencia de gametos propios, que afecta a un gran número de parejas infértiles, solo puede resolverse mediante su donación. Al respecto, se acepta que la donación de óvulos es más compleja de realizar que la donación de espermatozoides. Esta última se realiza hace muchos años, tanto en Chile como en el resto del mundo, ya que la obtención de espermatozoides es un procedimiento sencillo y no invasivo, existiendo bancos de semen extranjeros, que cumplen con exigentes regulaciones internacionales. En

cambio, la donación de óvulos, tanto en Chile, como en otros países, ofrece varias dificultades: las pacientes que se someten a tratamientos de reproducción asistida no acceden a donar sus óvulos. Los utilizan para ellas mismas, ya que existe la posibilidad de vitrificar ovocitos o de criopreservar embriones para su uso posterior. Además, se hace difícil encontrar donantes anónimas y altruistas, ya que los procedimientos para producir un mayor número de óvulos son invasivos y no exentos de riesgos. Por otra parte, no existe legislación en esta materia y si se aplicara a la donación de óvulos, la ley de donación de órganos, ésta prohíbe la recompensa económica por donar.

En conclusión, los progresos recientes sugieren que la ingeniería de tejidos, tendrá en un futuro próximo una creciente aplicación clínica en medicina reproductiva, pues representa una opción terapéutica válida para aquellos que requieren reemplazo de tejidos. La aplicación de ésta tecnología, junto a los recientes avances en las investigaciones con células madre y el uso de técnicas de transferencia nuclear, han permitido el desarrollo de la medicina regenerativa, pero aún es pronto para establecer un pronóstico respecto de la velocidad con que seguirán avanzando, hasta su total aplicación clínica. De hecho, con respecto al tema de la obtención de células germinales femeninas, hasta ahora existen 2 corrientes contrapuestas, una que sostiene que podrían derivar de la médula ósea y colonizar el ovario (Johnson et al) y otra que sostiene que serían de origen epitelial de la corteza del ovario, que al entrar en la circulación podrían llegar a la médula ósea (Bukovsky et al.). Aún se requiere mucha investigación básica en el laboratorio, en modelos animales y su posterior aplicación clínica para obtener la respuesta final.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koh CJ, Atala A. Tissue Engineering, Stem Cells and Cloning: Opportunities for Regenerative Medicine. *J Am Soc Nephrol* (2004);15(5): 1113-1125.
2. Watanabe M, Shin'oka T, Tohyama S, Hibino N, Konuma T, Matsumura G, et al. Tissue Engineered Vascular Autograph: Inferior vena cava replacement in dog model. *Tissue Eng* (2001); 7(4):429-439.
3. Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, Breuer CK, Cusick RA, Zund G, et al. Tissue engineered heart-valves: Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* (1996); 94 (9 suppl): II164-II168.
4. Shin'oka T, Imai Y., Ikada Y. Transplantation of a tissue engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* (2001); 344(7): 532-533.
5. Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB. Endoscopic treatment of vesicouretral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol* (1994); 152 (2 Pt 2): 641-644.
6. Diamond DA, Caldamone AA. Endoscopic correction of vesico ureteral reflux in children using autologous chondrocytes: Preliminary results. *J Urol* (1999); 162 (3 Pt 2): 1185-1188.
7. Bent AE, Tutrone RT, McLennan MT, Lloyd LK, Kennelly MJ, Badlani G. Treatment of intrinsic sphincter deficiency using autologous ear chondrocytes as a bulking agent. *Neurourol Urodyn* (2001); 20(2):157-165.
8. Tai J, Johnson HW, Tze WJ. Successful transplantation of Leydig cells in castrated inbred rats. *Transplantation* (1989); 47(6): 1087-1089.
9. Machluf M, Orsola A, Boorjian S, Kershen R, Atala A. Microencapsulation of Leydig cells : a system for testosterone supplementation. *Endocrinology* (2003); 144(11): 4975-4979.
10. De Vos P, De Haan B, Van Schilfgaarde R. Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules. *Biomaterials* (1997); 18(3):273-278.
11. Kwon TG, Yoo JJ, Atala A. Autologous penile corpora cavernosa replacement using tissue engineered techniques. *J Urol* (2002);168(4 Pt 2): 1754-1758.

12. Wang T, Koh CJ et al.. Creation of an Engineered Uterus for Surgical Reconstruction. Presented at the Proceedings of the American Academy of Pediatrics, Section of Urology. New Orleans, 2003).
13. Brivanlou AH, Gage FH, Jaenisch R, Jessell T, Melton D, Rossant J. Stem Cells: Setting Standards for Human Embryonic Stem Cells. *Science* (2003); 300(5621): 913-916.
14. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear Transplantation, Embryonic Stem Cell Research. *Science* (2001); 292; 1299.
15. Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL., et al.. Parthenogenetic stem Cells in Nonhuman Primates. *Science* (2002); 295(5556): 819.
16. Zuckerman S. The number of oocyte in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* (1951); 6: 63-108.
17. Zuckerman S., Baker TG. The development of the ovary and the process of oogenesis. In *The Ovary*. S. Zuckermann and B.J. Weir (eds.). New York Academic Press; 1977: pp:41-67.
18. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* (1992); 7(10): 1342-1346.
19. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001); 2(11): 838-848.
20. Richardson SJ., Senikas V., Nelson JR. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab.* (1987); 65(6): 1231-1237.
21. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod.* (1996); 11(10):2217-2222.
22. Encuesta Clínica Las Condes-Adimark, 2008.
23. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Johnson et al.. Germline stem cells and follicular renewal in the post natal mammalian ovary. *Nature* (2004); 428 (6979):145-150.
24. Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* (2005); 5; 3:17
25. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, et. Al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* (2005); 122 (2): 303-315.
26. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet* (1999);21(2) :200-203.
27. Gosden RG. Germline Stem Cells in the post natal ovary: is the ovary more like a testis? *Hum Reprod Update* (2004); 10 3): 193-195.
28. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* (2004); 2:20.
29. Liu J, Malhotra R, Voltarelli J, Stracieri AB, Oliveira L, Simoes BP, Ball ED, Carrier E. Ovarian recovery after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2008); 41(3): 275-278.

La autora declara no tener conflictos de interés, en relación a este artículo.