



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado 3139 en Medicina. Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Universidad de Valencia.

Trasplante autólogo de médula ósea en ovario en mujeres con baja reserva ovárica y fallo ovárico precoz, para rejuvenecimiento del nicho ovárico y favorecimiento del desarrollo folicular

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Nuria Pellicer de Castellví

Dirigida por:

Prof. Antonio Pellicer Martínez

Dra. Sonia Herraiz Raya

Valencia, abril 2020



Prof. Antonio Pellicer Martínez, Catedrático de Obstetricia y Ginecología, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, fundador del Instituto Valenciano de Infertilidad y presidente de la Fundación IVI.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Trasplante autólogo de médula ósea en ovario en mujeres con baja reserva ovárica y fallo ovárico precoz, para rejuvenecimiento del nicho ovárico y favorecimiento del desarrollo folicular”** ha sido realizado íntegramente por Nuria Pellicer de Castellví bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 27 de abril de 2020.

Fdo. Prof. Antonio Pellicer Martínez



Dra. **Sonia Herraiz Raya**, Doctora en Biología, Investigadora principal del área de Rejuvenecimiento ovárico y Preservación de la fertilidad en Fundación IVI (FIVI) y miembro del grupo de Investigación en Medicina Reproductiva del Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Trasplante autólogo de médula ósea en ovario en mujeres con baja reserva ovárica y fallo ovárico precoz, para rejuvenecimiento del nicho ovárico y favorecimiento del desarrollo folicular”** ha sido realizado íntegramente por Nuria Pellicer de Castellví bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 27 de abril de 2020.

Fdo. Dra. Sonia Herraiz Raya

AGRADECIMIENTOS

Es la primera vez que escribo unos “Agradecimientos” de manera explícita, pero no por ello es la primera vez que me he sentido agradecida. De hecho, he sentido gratitud durante todos estos años: durante el periodo en el que he realizado este doctorado, por supuesto, pero también anteriormente, durante mis primeros años de residencia y durante la etapa en la que fui estudiante de medicina.

La realidad es, que fueron todos esos años de formación, tanto durante la carrera como durante la residencia en el Hospital La Fe, los que me permitieron plantearme hacer un doctorado desde un principio. Intelectualmente, me dieron los cimientos sobre los cuales he podido construir. Pero quizás, más importante, me dotaron de resiliencia y dedicación, cualidades que sabía que iba a necesitar con creces para poder completar este proyecto. Quizás, el aspecto más difícil de estos años, en el ámbito académico, ha sido escribir (y terminar) esta tesis, para la cual mis conocimientos de medicina, y mis cualidades personales, resultaron ser necesarios pero no suficientes. Ha sido en esta fase tan concreta, en la cual me he dado cuenta de lo importante que es rodearse de personas que te apoyan. En mi caso, tengo mucha suerte de contar con muchas, y hoy me gustaría darles las gracias de forma explícita.

En primer lugar, gracias a mi familia, por haberme apoyado desde el principio. Gracias Papá por inspirarme, por enseñarme el camino que podía recorrer y acompañarme en cada paso que daba. Por ser mi ejemplo a seguir, y mi motivación cada día. Gracias por ser el mejor padre y mentor que cualquiera podría desear. Gracias Mamá por escucharme, por asegurarme que todo iba a salir bien, y por darme fuerzas para continuar cuando más lo necesitaba. Por estar siempre a mi lado, y apoyarme siempre en los momentos más difíciles. Gracias a mis hermanos, por celebrar todos mis logros y ser testigos de mis aventuras: gracias, Luis por siempre sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba, y Rosa, porque pese a que eres mi hermana pequeña, siempre eres mi pilar de apoyo y la persona en la que más puedo confiar.

Gracias también a mis compañeros de residencia (a mis 4 CoRs: Julia, Manu, Raquel y Sheila), a mis 2 residentes pequeñas, María y Reyes, y a Andrea y María la coja. Habéis sido una pieza fundamental de este proceso, no solo como compañeros de profesión, si no como amigos. Gracias por haber estado a mi lado, día tras día, sin importar lo que tocara. Por los momentos difíciles, en los que me animabais a seguir, y por los momentos divertidos, en los que la risa y las anécdotas eran la mejor terapia. Por estar siempre disponibles. Muchas gracias.

Gracias a mis amigas de la universidad, a Ampa (mi persona), Elena, Berta, Marta, que pese a la distancia que la residencia y las guardias han ocasionado, siempre están ahí presentes. Sois probablemente las personas más positivas que conozco y las mejores amigas que nadie podría tener.

Y sin duda, gracias, miles de gracias, a mi directora de tesis, Sonia, que no solo ha actuado como directora, si no, una vez más, como amiga. Gracias por estar disponible para mi a cualquier hora del día, a pesar de mi insistencia, por saber aconsejarme de la mejor manera posible, y por apoyarme cuando anímicamente más lo necesitaba. Gracias por ayudarme absolutamente en todo. Nunca podría haber elegido a una directora de tesis mejor.

Finalmente, gracias a todos mis amigos y compañeros, a todas las personas que han formado parte de esta experiencia, de esta década de mi vida, y que me habéis ayudado a llegar hasta aquí.

La presente tesis doctoral ha sido realizada en la unidad de Reproducción Humana del servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario y Politécnico la Fe, junto con la cercana colaboración del banco de sangre procedente al servicio de Hematología, y del servicio de Radiología Intervencionista. Se trata de un proyecto que exige una estrecha colaboración entre diferentes áreas clínicas del Hospital la Fe y grupos de investigación. Así mismo, todas técnicas de biología molecular se han llevado a cabo en el laboratorio de investigación de la Fundación IVI, situado en la Torre A del Hospital la Fe de Valencia, y en los laboratorios de investigación del grupo acreditado en Medicina Reproductiva. Gracias a la ayuda PROMETEO/2018/137 de la Generalitat Valenciana y a la Consellería de Educación, Investigación, Cultura y Deporte.

RESUMEN

Como consecuencia del retraso de la maternidad a causa de las tendencias sociales actuales, existe una disminución de la calidad y cantidad de ovocitos disponibles. Al problema fisiológico de la edad materna avanzada, se suman dos patologías, que asocian una baja reserva ovárica, en pacientes jóvenes: *baja respuesta ovárica* (del inglés, *poor ovarian response*, o POR), e insuficiencia ovárica prematura (del inglés, *premature ovarian insufficiency* o POI).

Numerosos protocolos de estimulación ovárica han sido desarrollados, sin ser efectivos, siendo en la mayoría de los casos, la única opción para estas pacientes la donación de ovocitos/embriones.

Varios trabajos de investigación han descrito la presencia de folículos primordiales en pacientes POR, POI y mujeres postmenopáusicas. El objetivo sería rescatar estos folículos, tras regenerar el nicho ovárico.

Nuestro grupo de investigación, desarrolló un estudio experimental en modelo animal, en donde se demostró que, en ratones con POR y POI inducido por quimioterapia, el trasplante de células madre derivadas de médula ósea (bone marrow derived stem cells, BMDSC) producía un aumento del número de folículos antrales (AFC), tasa de ovulación, vascularización y proliferación del estroma ovárico, reduciendo la apoptosis(1). Estos estudios fueron validados en tejido ovárico humano xenotrasplantado en ratones inmunodeficientes.

Tras estudios realizados por otros grupos de investigación, y nuestros resultados en modelo animal, consideramos que las terapias basadas en BMDSC podrían ser una alternativa para incrementar el potencial reproductivo de pacientes POR y POI.

Realizamos un estudio piloto para evaluar los efectos tras el trasplante en la arteria ovárica de BMDSC en 20 POR (ASCOT, "autologous stem cell ovarian transplant"). Se evidenció un incremento de la reserva ovárica en 74% de las pacientes (AMH y AFC), con una correlación positiva entre los factores solubles FGF-2 y THSP-1 y el aumento de la reserva ovárica. Dieciocho pacientes realizaron ciclos de FIV, obteniendo 57 ovocitos MII, 40 embriones, 6 gestaciones, y 3 recién nacidos vivos.

En segundo lugar, decidimos realizar una segunda fase del estudio ASCOT con pacientes POI. En este caso además se incluyó un segundo brazo de estudio empleando una técnica menos invasiva. En esta 2ª rama del estudio (movilización), las células madre se movilizaban desde médula ósea a sangre periférica, sin aféresis e infusión celular posterior. Esta fase del estudio no ha podido ser finalizada como consecuencia de la pandemia global por el SARS-CoV2 (10 pacientes reclutadas hasta la fecha). En un análisis interino, se ha evidenciado una mejoría de parámetros de la reserva ovárica, con un incremento del recuento de AFC en 7 pacientes, de los niveles séricos de AMH en 3 pacientes, y una mejoría de ambos marcadores en un 30%. Seis pacientes sufrieron un descenso de los niveles de FSH y un 40% refirieron un retorno de la menstruación a lo largo del seguimiento. Tras finalizar el seguimiento, 2 pacientes presentaron menstruaciones regulares. Tras el tratamiento con BMDSC, 6 pacientes iniciaron ciclos de FIV (2 de la rama movilización y 4 de la rama ASCOT), obteniendo 4 ovocitos MII, 2 embriones (1 de cada rama del estudio), y logrando una gestación evolutiva (de la rama ASCOT).

En conclusión, los resultados obtenidos en estos trabajos sugieren que las terapias basadas en BMDSC podrían ser una alternativa futura para incrementar el potencial reproductivo en pacientes POR y POI.

ABSTRACT

A growing number of women are seeking to postpone motherhood due to the socio-economic changes experienced by our society, which in turn leads to a decrease in quality and quantity of present oocytes. Furthermore, there are two pathologies affecting young women, which result in low ovarian reserve at a young age: poor ovarian response (POR), y premature ovarian insufficiency (POI).

POR and POI women are a challenge for reproductive practitioners, as many ovarian stimulation (COS) protocols have been tested, but none of them has been proved to be successful, due to the absence of stimuable antral follicles, and for most, the only practical option is egg/embryo donation.

New techniques have arisen based on the theory of dormant primordial follicles present in POR, POI and even postmenopausal women. The objective is to rescue these follicles to growth by providing an adequate ovarian niche.

Our group developed an experimental study using a chemotherapy-induced POR and POI mice models to test this hypothesis by bone marrow derived stem cells (BMDSC) transplant. Our results showed that BMDSC were able to increase number of antral follicles, ovulation rate and cumulative pregnancy rate by promoting ovarian stroma vascularization, cell proliferation, and reducing apoptosis (1). These results were also validated in human ovarian tissue xenografted in to immunodeficient mice.

These promising results, all together with studies developed by other researchers, suggested that BMDSC therapies could be an alternative to increase the reproductive potential in POR and POI women.

Thus, we developed a pilot study to evaluate effects of ovarian transplantation of BMDSC in 20 POR women (ASCOT, autologous stem cell ovarian transplantation). Ovarian reserve biomarkers increased in 74% of patients (AMH and antral follicular count (AFC), showing a positive correlation with the rise in plasmatic soluble factors (FGF-2 y THSP-1). Eighteen patients underwent COS cycles, obtaining 57 MII oocytes, 40 embryos, and 3 live births.

Then, we decided to carry out a second phase study with POI patients to test ASCOT but also applying a less invasive technique in a second study arm; cells were mobilized into peripheral blood after G-CSF treatment, but no apheresis or infusion was carried out in this study arm. Nonetheless, this second study has not been yet completed as a consequence to SARS-CoV2 global pandemic, and 10 patients have been recruited till now. After an interim analysis, ovarian reserve markers have improved, with a raise in AFC in 7 patients, increase in AMH in 3 patients, and improvement of both parameters in 30% of women. Also, 6 patients suffered a decrease in FSH levels, and 40% reported menses return during follow-up. Two patients continued having regular menses after the end of the follow-up. Six patients started COS cycles, obtaining 4 MII oocytes, 2 embryos (1 from ASCOT arm, and 1 from mobilization arm), and one ongoing pregnancy (from ASCOT arm).

In conclusion, the results from these investigations suggest that BMDSC therapies could be a future alternative to increase the reproductive potential in POR and POI patients.

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| 7-AAD | 7- aminoactinomicina D |
| ADN | Ácido D esoxirribonucleico |
| AFC | Del inglés Antral Follicle Count o recuento de folículos antrales. |
| AMH | Del inglés Anti-Müllerian Hormone o hormona Anti-Mülleriana |
| APOC3 | A polipopoteína C3 |
| ASCOT | Del inglés, Autologous Stem Cell Ovarian Transplantation |
| ASEBIR | A sociación para el E studio de la B iólogía de la R eproducción |
| BMDSC | Del inglés, Bone Marrow Derived Stem Cells |
| BMP-6 | Del inglés, Bone Morphogenetic Protein 6 |
| CDI | C arcinoma D uctal I nfiltrante |
| CEIm | C omité É tico de I nvestigación con m edicamentos |
| CLBR | Del inglés, Cumulative Live Birth Rate , o tasa de recién nacido vivo acumulada. |
| CMV | C itomegalolvirus |

| | |
|----------------------|---|
| CPSP | Células P rogenitoras de S angre P eriférica |
| DA | Del inglés, <i>Discriminant Analysis</i> |
| DE | Desviación E stándar |
| DHEA | D eshidroepiandrosterona |
| EDTA | Del inglés, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> , o Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGF | Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| EOC | Estimulación O várica C ontrolada |
| EPCR | Del inglés, <i>Endothelial Protein C Receptor</i> , o receptor endothelial de la proteína C |
| EtOH | Etanol |
| FDR | Del inglés, <i>False Discovery Rate</i> , o detección de falsos descubrimientos. |
| FGF1 – y FGF2 | Del inglés, <i>Fibroblast Growth Factor 1 and 2</i> |
| FIV | Fecundación I n V itro |
| FPS | Del inglés, <i>Follicular Phase Stimulation</i> , o estimulación en fase folicular. |

| | |
|---------------|---|
| FSH | Del inglés, <i>Follicle Stimulating Hormone</i> , u Hormona Foliculoestimulante |
| G-CSF | Del inglés, <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i> o de factor estimulante de colonias granulocíticas |
| GFP | Del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| HGF | Del inglés, <i>Hepatocyte Growth Factor</i> |
| HLA | Del inglés <i>Human Leukocyte Antigen</i> o antígeno leucocitario humano |
| HMG | Del inglés, <i>Human Menopausal Gonadotropin</i> , o gonadotropina menopáusica humana o |
| HTLV-1 | Del inglés, <i>Human T-Lymphotropic Virus type 1</i> , o Virus linfotrópico humano de células T tipo 1 |
| HTLV-2 | Del inglés, <i>Human T-Lymphotropic Virus type 2</i> , o virus linfotrópico humano de células T tipo 2 |
| IA | Inseminación Artificial |
| ICSI | Del inglés, <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i> o inyección intracitoplasmática espermática |
| IGF-1 | Del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor</i> |
| IL-11 | Del inglés, <i>Interleukin-11</i> o <i>interleuquina 11</i> |

| | |
|--------------|--|
| IMC | Índice de M asa C orporal |
| iPS | Del inglés, <i>induced Pluripotent Stem cells</i> , o células madre pluripotentes inducidas |
| IQR | <i>Del inglés Interquartile Range</i> , o Rango Intercuartílico |
| IVA | Del inglés, <i>In Vitro Activation</i> o activación in vitro |
| JAICE | <i>Joint Accreditation Committee ISCT- Europe & EBMT</i> |
| KL | Del inglés, <i>Kit- Ligand</i> o <i>Kit Ligando</i> |
| LC-MS | Del inglés <i>Liquid Chromatography- Mass Spectrometry</i> , o cromatografía líquida - espectrometría de masas |
| LH | Linfoma H odgkin |
| LH | Del inglés, <i>Luteinizing Hormone</i> u Hormona Luteinizante |
| LOD | Factor de detección |
| LPS | Del inglés, <i>Luteal Phase Stimulation</i> , o estimulación en fase lútea. |
| MII | M etafase I I |
| MIS | Del inglés, <i>Müllerian Inhibitory Substance</i> o Sustancia Inhibidora Mülleriana |

| | |
|-----------------|--|
| MO | Médula ósea |
| MOS | Del inglés, <i>Minimal Ovarian Stimulation</i> |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NAD+ | Del inglés, <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> |
| NMN | Del inglés, <i>Nicotinamide Mononucleotide</i> |
| OPU | Del inglés, <i>Oocyte Pick-Up</i> , o punción de ovocitos. |
| PCA | Del inglés, <i>Principal Component Analysis</i> |
| PDGF- BB | Del inglés, <i>Platelet-Derived Growth Factor Beta</i> , o factor de crecimiento derivado de plaquetas BB |
| PE | Phycoerythrin |
| PGT -A | Del inglés, <i>Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies</i> , o test genético preimplantacional para aneuploidías. |
| PIK3 | Del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> |
| POI | Del inglés <i>Premature Ovarian Insuficiency</i> o Insuficiencia ovárica prematura |

| | |
|-------------------------------|--|
| POR | Del inglés <i>Poor Ovarian Response/Responders</i> o Baja Respuesta Ovárica |
| PRP | Plasma Rico en Plaquetas |
| PTEN | Del inglés, <i>Phosphatase and Tensin homolog</i> |
| RNV | Recién Nacido Vivo |
| SDS-PAGE | Del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , o electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| SET | Del inglés, <i>Single Embryo Transfer</i> o transferencia de embrión único. |
| SWATH LCMS/MS | Del inglés, <i>Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra</i> |
| TEAB | Del inglés, <i>Tetraethylammonium Bromide</i> , o tetraetilamonio bromuro |
| TGF-β | Del inglés, <i>Transforming Growth Factor β</i> |
| THBG | Serpin-7 o del inglés, <i>Thyroxine-Binding Globulin</i> |
| THSP-1 | Del inglés, <i>Thrombospondin-1</i> |
| TMO | Trasplante de Médula Ósea |
| TNFα | Del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor α</i> , o factor de necrosis tumoral alfa |

| | |
|--------------|---|
| TRA | Técnicas de R eproducción A sistida |
| UI | U nidad I nternacional |
| VCAM1 | Del inglés, <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> |
| VDBP | Del inglés, <i>Vitamin D-Binding Protein</i> , o proteína transportadora de la vitamina D |
| VEB | V irus de E pstein B arr |
| VEGF | Del inglés, V ascular E ndothelium G rowth F actor |
| VHA | V irus H epatitis A |
| VHB | V irus H epatitis B |
| VHC | V irus H epatitis C |
| VHS | V irus H erpes S imple |
| VIH | V irus de la I munodeficiencia H umana |
| VVZ | V irus V aricela - Z oster |
| YAP | Del inglés, <i>Yes Associated Protein</i> |

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. DILEMA DEL SIGLO XXI: EL ENVEJECIMIENTO REPRODUCTIVO Y LA IMPORTANCIA DE MANTENER E INCREMENTAR LA FERTILIDAD | 3 |
| 1.2. FISIOLÓGÍA OVÁRICA: UN RELOJ BIOLÓGICO ACELERADO E IMPARABLE | 8 |
| 1.3. POR: <i>POOR OVARIAN RESPONSE/RESPONDERS</i> O BAJA RESPUESTA OVÁRICA | 14 |
| 1.4. POI: <i>PREMATURE OVARIAN INSUFFICIENCY</i> O INSUFICIENCIA OVÁRICA PREMATURA..... | 21 |
| 1.5. EL CONCEPTO DE “RESCATE OVÁRICO” | 23 |
| 1.6. LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS | 26 |
| 1.7. EL OVARIO COMO ÓRGANO DIANA DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS | 31 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 43 |
| 2.1 HIPÓTESIS..... | 43 |
| 2.2 OBJETIVOS | 45 |
| 2.2.1. <i>Objetivo principal</i> | 45 |
| 2.2.2. <i>Objetivos secundarios en POR Y POI</i> | 45 |
| 2.2.3 <i>Objetivos secundarios únicamente estudiados en POI</i> | 45 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 49 |
| 3.1. ASCOT POR (ASCOT-1)..... | 49 |
| 3.1.1. <i>Diseño del estudio</i> | 49 |
| 3.1.2. <i>Movilización células madre desde médula ósea y aféresis</i> | 52 |
| 3.1.2.1. <i>Movilización células madre desde médula ósea</i> | 52 |
| 3.1.2.2. <i>Recolección celular y aféresis</i> | 53 |
| 3.1.3. <i>Análisis de las poblaciones celulares de la aféresis</i> | 54 |
| 3.1.4. <i>Cateterización intraarterial</i> | 55 |
| 3.1.5. <i>Seguimiento de las pacientes</i> | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.6. EOC, ICSI, protocolos de screening genético embrionario (PGT-A) y transferencia embrionaria..... | 57 |
| 3.1.6.1. Estimulación ovárica e ICSI..... | 57 |
| 3.1.6.2. PGT-A..... | 58 |
| 3.1.6.3. Transferencia embrionaria..... | 59 |
| 3.1.7. Cuantificación de factores solubles secretados por BMSDC en aféresis..... | 59 |
| 3.1.8. Análisis perfil proteómico en muestras de plasma de pacientes mediante SWATH LC/MS. | 62 |
| 3.1.8.1. Recolección de muestras y asilamiento del plasma..... | 63 |
| 3.1.8.2. Análisis proteómico..... | 63 |
| A) Preparación del pool de proteínas, extracción y digestión de las muestras..... | 63 |
| B) LC-MS/MS y construcción de la librería de proteínas..... | 65 |
| C) Extracción, cuantificación y digestión de muestras individuales | 66 |
| D) Análisis LC-MS/MS y SWATH™ de muestras plasmáticas individuales..... | 67 |
| 3.1.9. Análisis estadístico | 70 |
| 3.2. ASCOT POI (ASCOT-2): ASCOT Y MOVILIZACIÓN G-CSF..... | 73 |
| 3.2.1. Diseño del estudio | 73 |
| 3.2.2. Tratamiento de las pacientes: Movilización de células madre desde médula ósea a sangre periférica..... | 76 |
| 3.2.2.1. Movilización y selección de Células Progenitoras en Sangre Periférica (CPSP)..... | 76 |
| 3.2.2.2. Aféresis y recolección celular..... | 77 |
| 3.2.3. Cateterismo intraarterial | 77 |
| 3.2.4. Seguimiento de las pacientes..... | 77 |
| 3.2.5. EOC, ICSI, y transferencia embrionaria | 78 |
| 3.2.6. Estudios experimentales..... | 79 |
| 3.2.7. Análisis estadístico | 80 |
| 4. RESULTADOS | 85 |

| | |
|---|------------|
| 4.1. ASCOT POR (ASCOT-1)..... | 85 |
| 4.1.1. <i>Características de las pacientes</i> | 85 |
| 4.1.2. <i>Técnica ASCOT</i> | 87 |
| 4.1.3. <i>Composición celular del injerto</i> | 88 |
| 4.1.4. <i>Reserva ovárica</i> | 90 |
| 4.1.5. <i>Factores de crecimiento solubles liberados tras ASCOT</i> | 94 |
| 4.1.6. <i>Resultados FIV y reproductivos</i> | 96 |
| 4.1.7. <i>Proteómica</i> | 103 |
| 4.2. ASCOT POI: ASCOT Y MOVILIZACIÓN G-CSF..... | 109 |
| 4.2.1. <i>Características de las pacientes</i> | 109 |
| 4.2.2. <i>Técnica: Movilización celular a sangre periférica, aféresis e</i> <i>infusión celular</i> | 113 |
| 4.2.3 <i>Composición celular del injerto</i> | 115 |
| 4.2.4 <i>Reserva ovárica</i> | 116 |
| 4.2.5 <i>Síntomas vasomotores y recuperación de menstruación</i> | 120 |
| 4.2.6 <i>Factores de crecimiento solubles liberados tras ASCOT</i> | 122 |
| 4.2.7 <i>Resultados FIV y reproductivos</i> | 123 |
| 4.2.8. <i>Proteómica</i> | 128 |
| 5. DISCUSIÓN | 133 |
| 5.1. EL ESTUDIO ASCOT-1 (PACIENTES POR)..... | 134 |
| 5.1.1. <i>BMDSC: composición celular y factores solubles liberados por las</i> <i>BMDSC con acción paracrina</i> | 136 |
| 5.1.2. <i>Proteómica</i> | 140 |
| 5.1.3. <i>Aneuploidías</i> | 141 |
| 5.1.4. <i>Variabilidad inter-pacientes</i> | 142 |
| 5.2. EL ESTUDIO ASCOT-2 (PACIENTES POI)..... | 143 |
| 5.2.1. <i>BMDSC: Composición celular y factores solubles liberados por</i> <i>las BMDSC con acción paracrina</i> | 147 |
| 5.2.2. <i>Proteómica</i> | 148 |
| 5.2.3. <i>Variabilidad</i> | 150 |
| 5.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO..... | 151 |
| 5.4. OTRAS TERAPIAS DE RESCATE OVÁRICO EMPLEADAS HASTA LA FECHA ... | 152 |
| 5.5. FUTURAS ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES..... | 154 |

| | |
|---|------------|
| 6. CONCLUSIONES | 161 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 165 |
| 8. ANEXOS | 185 |
| 8.1 ANEXO I: PUBLICACIONES Y TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS DE LA ESTUDIANTE PRE-DOCTORAL | 185 |
| 8.1.1. <i>Publicaciones científicas internacionales</i> | 185 |
| 8.1.2. <i>Trabajos presentados a congresos nacionales e internacionales</i> | 187 |
| 8.2. ANEXO II: CONSENTIMIENTOS INFORMADOS | 193 |
| 8.2.1. <i>Consentimiento informado en ASCOT-1 para pacientes POR.</i> | 193 |
| 8.2.2. <i>Consentimiento informado en ASCOT-2 para pacientes POI ..</i> | 195 |
| 8.3. ANEXO III: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE | 197 |
| 8.3.1. <i>Hoja de información al paciente en ASCOT-1 para pacientes POR</i> | 197 |
| | 204 |
| 8.3.2. <i>Hoja de información al paciente en ASCOT-2 para pacientes POI</i> | 205 |
| 8.4. ANEXO IV: ARTÍCULOS RELACIONADOS CON LA TESIS DOCTORAL, ADJUNTADOS..... | 213 |

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- **Figura 1:** Edad media materna al nacimiento del primer hijo, en función del nivel educacional.
- **Figura 2:** Probabilidad de recién nacido vivo acumulado en función de la edad.
- **Figura 3:** Foliculogénesis
- **Figura 4:** La AMH como marcador de la reserva ovárica.
- **Figura 5:** EOC con gonadotropinas y letrozol.
- **Figura 6:** Protocolo EOC con citrato de clomifeno (MOS).
- **Figura 7:** Protocolo de doble estimulación.
- **Figura 8:** Población de folículos primordiales, desde el nacimiento hasta la menopausia.
- **Figura 9:** Procedimientos realizados por el grupo de Kawamura.
- **Figura 10:** Efectos de las células madre sobre la regeneración cardíaca.
- **Figura 11:** Tipos de células madre adultas y progenitoras derivadas de medula ósea.
- **Figura 12:** Análisis genético del ADN de la madre, de la hija y del donante.
- **Figura 13:** Protocolo de aislamiento de las células madre en línea germinal del ovario
- **Figura 14:** Resultados tras el tratamiento con BMDSC en ratones.
- **Figura 15:** Inyección de células madre mesenquimales en ovario vía laparoscópica.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Figura 16:** Diagrama de la técnica ASCOT.
- **Figura 17:** Cateterización intraarterial de la arteria ovárica.
- **Figura 18:** EOC en pacientes POR tras ASCOT

- **Figura 19:** PGT-A en los embriones obtenidos por FIV tras ASCOT
- **Figura 20:** Gel coomasie coloidal.
- **Figura 21:** Total de iones cuantificados para el pool de muestras utilizados para construir la librería
- **Figura 22:** Esquema de funcionamiento de la técnica SWATH
- **Figura 23:** Total de iones cuantificados por muestra SWATH
- **Figura 24:** Proceso de generación de las muestras.
- **Figura 25:** Área bajo de la curva de una de las muestras, que identifica las distintas proteínas.
- **Figura 26:** Los dos grupos de estudio de ASCOT-2.

RESULTADOS

- **Figura 27:** Proceso de reclutamiento de las pacientes POR en ASCOT-1.
- **Figura 28:** Progresión individual de recuento de folículos antrales (AFC)
- **Figura 29:** Progresión individual de hormona Antimülleriana (AMH)
- **Figura 30:** Respuesta positiva a ASCOT (AMH y AFC)
- **Figura 31:** Correlación positiva entre los factores solubles y los biomarcadores de reserva ovárica.
- **Figura 32:** Análisis PCA y DA
- **Figura 33:** Análisis de las proteínas durante la aféresis (AFÉRESIS) y 3 meses tras ASCOT (POST).
- **Figura 34:** Análisis de expresión diferencial de proteínas.
- **Figura 35:** Proteínas expresadas de forma diferencial, PRE, AFÉRESIS, y POST ASCOT.
- **Figura 36:** Heatmap individual.
- **Figura 37:** Proceso de reclutamiento de las pacientes POI en ASCOT-2.
- **Figura 38:** Progresión individual de recuento de folículos antrales (AFC) en pacientes POI.
- **Figura 39:** variaciones individuales de FSH en ambas ramas del estudio.

- **Figura 40:** Etapa del seguimiento en el que se iniciaron los ciclos de FIV.
- **Figura 41:** Análisis Discriminante (DA).
- **Figura 42:** Análisis Discriminante.

DISCUSIÓN

- **Figura 43:** Mecanismo de acción por el cual las PRP activadas activan la función ovárica.

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Tabla 1:** LOD y variaciones intra- e inter- ensayo.

RESULTADOS

- **Tabla 2:** Características basales de las pacientes POR.
- **Tabla 3:** Resumen de los parámetros de la aféresis.
- **Tabla 4:** Composición celular de la aféresis.
- **Tabla 5:** Seguimiento de los biomarcadores de reserva ovárica tras ASCOT.
- **Tabla 6:** Concentración plasmática en aféresis de los factores solubles en pacientes POR, que presentaron una respuesta positiva o una no respuesta tras ASCOT.
- **Tabla 7:** Pacientes en estado basal, previo a FIV.
- **Tabla 8:** Resultados reproductivos tras ASCOT.
- **Tabla 9:** Resultados individuales post ASCOT, de pacientes que realizaron ciclos de FIV.
- **Tabla 10:** Características basales de las pacientes POI.
- **Tabla 11:** Resumen de los parámetros de movilización y aféresis en las pacientes POI.
- **Tabla 12:** Composición celular del injerto tras el tratamiento con BMDSC según la respuesta ovárica de la paciente.
- **Tabla 13:** Seguimiento del AFC, AMH y FSH tras el tratamiento con BMDSC, en ambas ramas del estudio.
- **Tabla 14:** Concentración plasmática de los factores solubles en pacientes POI, que presentaron una respuesta positiva tras el tratamiento con BMDSC.
- **Tabla 15:** Ciclos de IA y FIV pre y post tratamiento con BMDSC.
- **Tabla 16:** Resultados FIV de pacientes POI incluidas en el estudio.



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Dilema del siglo XXI: el envejecimiento reproductivo y la importancia de mantener e incrementar la fertilidad

Los seres humanos partimos con ciertas desventajas en la escala animal respecto a otras muchas especies. A diferencia del resto de mamíferos, los humanos no somos animales fértiles, con una tasa de fecundidad mensual en torno a un 20%. Se estima, que, al año, el 100% de las parejas fértiles conseguirán obtener una gestación evolutiva, no siendo así en las parejas con problemas de infertilidad. No obstante, la Organización Mundial de la Salud (OMS), considera la infertilidad como una enfermedad, que, según los datos del 2010 afecta hasta un 15% de las mujeres en edad reproductiva, y a 48.5 millones de parejas(2). Este porcentaje de la población va a requerir el apoyo de técnicas de reproducción asistida para poder obtener la gestación. A pesar de ello, numerosas parejas que buscan ayuda de especialistas en reproducción son subfértiles, y no infértiles, por lo que evolutivamente conseguirían gestar de forma espontánea(3).

Pero a esta disminución en fertilidad atribuible a la especie, hay que añadir un problema de mayor envergadura. Mientras el siglo XX fue un siglo de crecimiento de la población, el siglo XXI es un siglo donde vamos a asistir al envejecimiento de la población, favorecido sobre todo por un aumento de la expectativa de vida junto con una disminución de la fertilidad (4,5).

Esta disminución de la fertilidad que se ha evidenciado en este siglo se debe principalmente al cambio generado en las tendencias sociales actuales, que han derivado en un retraso en el inicio de la maternidad. Muchas mujeres han retrasado la edad a la que tienen su primer hijo a finales de la década de los 30 años, e incluso la década de los 40 años. De hecho, en los últimos 20 años se estima un retraso de la edad del primer hijo desde los 27 a los 29.3 años(4).

Este retraso de la maternidad se ha descrito en países con elevados ingresos económicos, tales como los países europeos, Estados Unidos, etc. (6,7).

Así mismo, este retraso del nacimiento del primer hijo se debe a la introducción de la mujer al trabajo, la mayor edad que presenta la mujer cuando finaliza los estudios, con un incremento de oportunidades educacionales y laborales, carreras universitarias, mejores salarios, que ha obligado a muchas mujeres a escoger entre la maternidad o un futuro laboral en una etapa crítica en la vida, que ha alterado el patrón reproductivo(4,6).

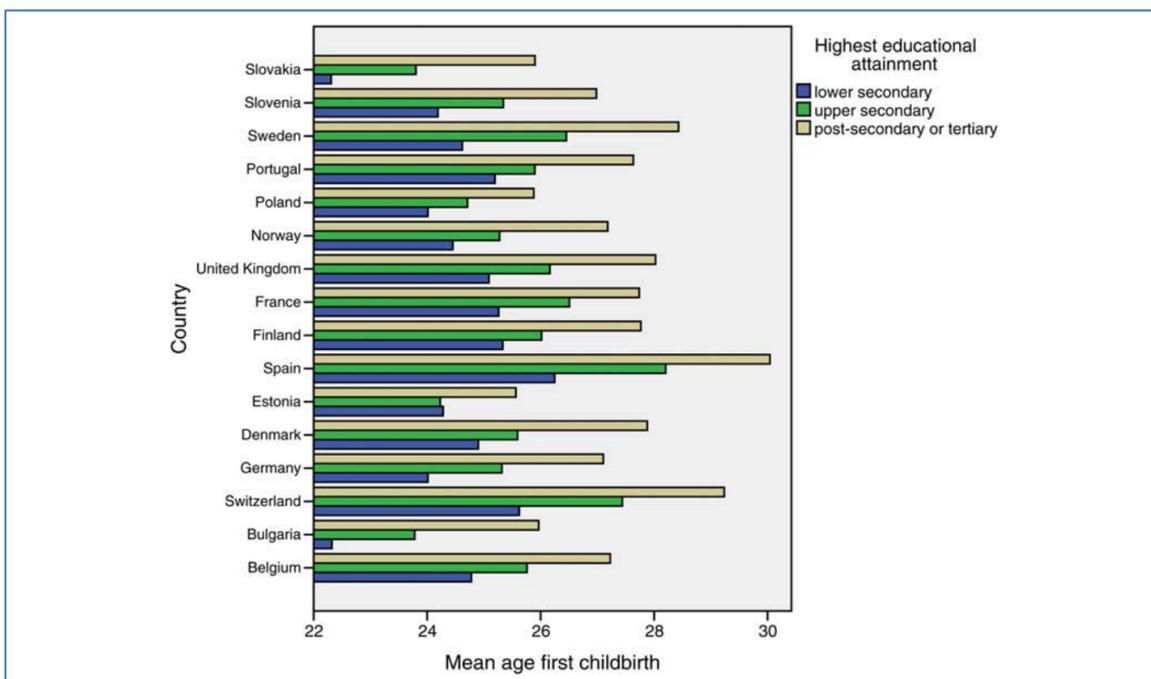


Figura 1: Edad media materna al nacimiento del primer hijo, en función del nivel educacional. Mujeres nacidas entre 1960 – 1969, en algunos países Europeos seleccionados (n=7307) (4).

Sin embargo, este no es la única circunstancia que ha motivado a este retraso en la maternidad, si no que existen múltiples factores que han contribuido de forma conjunta. Por un lado, con la introducción en 1960 de la anticoncepción en la población femenina, y su uso distendido, muchas mujeres han logrado un control de su propia reproducción, logrando su la emancipación y la no obligación de tener que ocuparse exclusivamente al rol de la maternidad. Esto ha

contribuido a lo previamente descrito, el deseo de las mujeres de crecer profesionalmente a la vez que logran controlar su reproducción de una forma segura. Desde otra perspectiva, el retraso de la maternidad también puede verse favorecido por el aumento de las parejas sentimentales, muchas de ellas con carácter inestable, la dificultad que conlleva afianzar una relación consolidada, y el aumento de la tasa de divorcios. De hecho, se estima que el tener una pareja estable es el segundo factor más importante para iniciar la maternidad, siendo la salud materna el factor más importante de cara a tener descendencia (4).

Otro elemento para tener en cuenta es el inadecuado conocimiento sobre la disminución de la fertilidad relacionado con la edad. Se sospecha que existe una errónea percepción sobre la longevidad de la fertilidad a largo plazo, que favorece a que las mujeres retrasen la maternidad (8). De la misma manera, muchas mujeres piensan falsamente, que la fecundación in vitro (FIV), puede revertir los efectos de la edad y son demasiado optimistas con los resultados que pueden obtener con la FIV. Los expertos recomiendan educación reproductiva, haciendo hincapié en este tema, ya sea desde los ámbitos más accesibles para el público, como los colegios, atención primaria, medios públicos, etc. El objetivo es concienciar a la población futura, y disminuir la falta de información que pueda existir al respecto. La prevención primaria es primordial, y podría promover a muchas mujeres que deseen retrasar su maternidad a una preservación de ovocitos mientras su fertilidad siga siendo óptima (9).

Y es que hay que considerar que la fertilidad femenina desciende progresivamente con la edad. Se estima que a partir de los 30 años este descenso comienza a ser significativo, siendo a mediados de los 35 años cuando el descenso se acelera de forma exponencial. Se considera que a los 37.5 años aproximadamente, la tasa de atresia folicular se acelera (10).

Por otra parte, la calidad ovocitaria también va a descender de forma progresiva con la edad, con un aumento de la tasa de aneuploidías, lo cual va a provocar como consecuencia un aumento de las anomalías genéticas. Esto no solo va a provocar un aumento de infertilidad, si no un aumento en la tasa de abortos (10).

Estudios poblacionales han demostrado una disminución en la tasa de recién nacido vivo (RNV) a partir de los 36 años. Así, por ejemplo, Cobo et al. (2018) demostraron esta disminución de fertilidad con la edad en mujeres que preservaron ovocitos por diversas causas, principalmente debido a causa social. Publicaron una tasa de RNV acumulada dependiente del número de ovocitos utilizados, relacionados con la edad. Según este grupo de investigación, en pacientes igual o menores de 35 años, la tasa de RNV fue significativamente mayor, en comparación con aquellas pacientes de 36 años o mayores. Con ocho ovocitos en el primer grupo, la tasa de RNV era de 40.9%, mientras que en el segundo grupo de 19.9%. Así mismo, con 10 ovocitos la probabilidad de RNV en el primer grupo ascendía a 60.5%, mientras que en el segundo grupo era de tan solo del 29.7%(11).

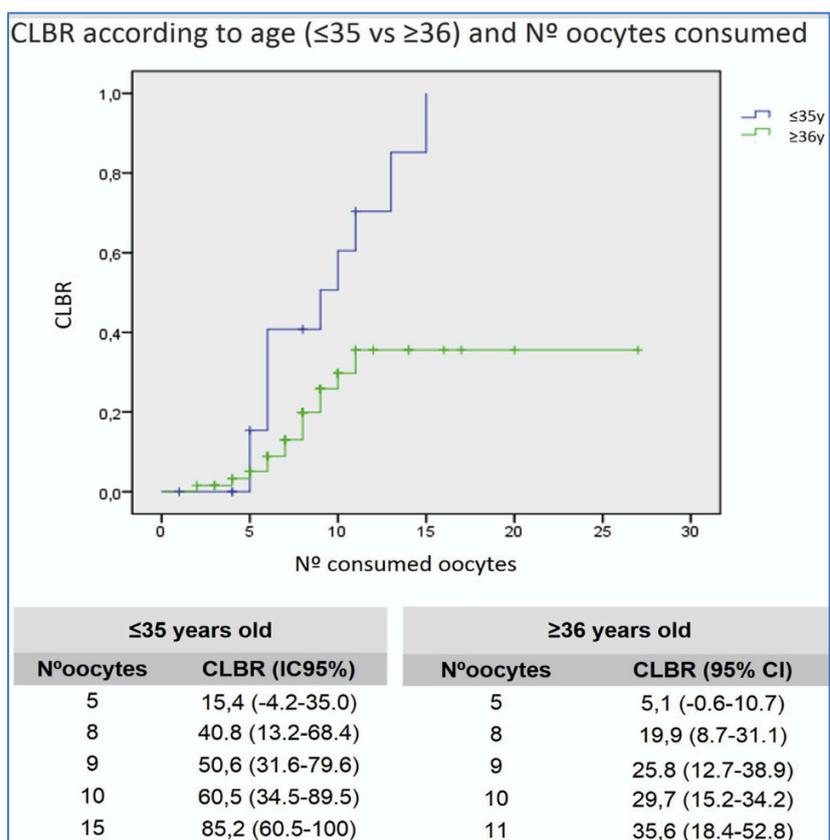


Figura 2: Probabilidad de recién nacido vivo acumulado en función de la edad. En esta figura se muestra la probabilidad de recién nacido vivo acumulada (en la imagen descrito como CLBR, o cumulative live birth rate). Se observa como esta tasa aumenta conforme incrementa el número de ovocitos obtenidos, en pacientes de 35 años o inferior. En cambio, en pacientes de 36 años o

superior, esta tasa se estanca, y no supera el 40% pese a que aumente el número de ovocitos obtenidos. Esto es debido al descenso en la calidad ovocitaria sufrida en pacientes a partir de esta edad (11).

El envejecimiento de la población y el consecuente aumento de la infertilidad es un problema socioeconómico de primera magnitud porque los países se están encontrando con verdaderos problemas para mantener los nacimientos y las campañas de fomento de la natalidad son poco, o nada, efectivas (2).

Además, la infertilidad se considera actualmente una patología crónica con consecuencias potencialmente negativas a nivel psicológico y mental, tanto para la población femenina como masculina. Va a provocar un sufrimiento emocional en los cinco campos más importantes del día a día: social, sexual, relacional, necesidad de paternidad, y el rechazo a una vida sin descendencia. La evidencia ha demostrado que hay dos fuentes principales por las cuales una pareja infértil puede sufrir estrés psicológico. Por un lado, el deseo de obtener descendencia propia sin éxito puede provocar un deterioro a nivel psicológico, ya que la reproducción puede ser para muchos uno de los objetivos primordiales en la vida. De hecho, muchas sociedades reconocen la maternidad y la paternidad como roles esenciales, y por tanto la infertilidad va a derivar en una pérdida de estos roles, que para muchos puede afectar negativamente. Por otro lado, la infertilidad va a derivar en un gran consumo de recursos por el uso adyuvante de técnicas de reproducción asistida, con tratamientos costosos, con calendarios estrictos y pesados, que a su vez pueden llevar a un estado de frustración y desesperanza (12).

Por otro lado, se estima que el estrés sufrido por mujeres es mayor que el sufrido por los varones, ya que históricamente la mujer juega un rol más importante en la reproducción (12).

En resumen, en este siglo XXI tenemos un reto fundamental: mantener tasas de natalidad que permitan hacer viables los sistemas sociales fundamentales, como pudieran ser el acceso gratuito a la educación, la sanidad o ayuda a la dependencia. Pero, por un lado, los problemas propios de la

especie, y por otro los cambios que han llevado a retrasar y restringir la maternidad/paternidad, hacen que el reto sea de primera magnitud. La Medicina Reproductiva puede ser de cierta ayuda, sin duda, pero no lo es todo.

1.2. Fisiología ovárica: Un reloj biológico acelerado e imparable

El desarrollo folicular comienza a partir de las 20 semanas de desarrollo fetal. Las células primordiales germinales, van a migrar desde el saco vitelino hasta la cresta gonadal, mientras sufren divisiones mitóticas (13). Al llegar a la cresta gonadal, las oogonias comienzan la primera división meiótica y se convierten en ovocitos primarios. Por otro lado, las células somáticas primitivas del ovario (células de la teca, de la granulosa, células intersticiales, células superficiales epiteliales, etc.), envuelven estas oogonias, para formar los folículos rudimentarios (de muy pequeño tamaño, menores de 0.1 mm de diámetro). Estos folículos que contienen ovocitos primarios, detenidos en la primera fase de meiosis, va a constituir la reserva ovárica. A partir de ese momento, va a comenzar el envejecimiento ovárico, que va a ser un proceso constante desde el momento de su creación. Por tanto, el máximo número de ovocitos que va a tener el ovario es durante la etapa fetal, en donde el ovario es suplementado con 6 – 7 millones de folículos primordiales (13,14). Desde este momento, el número de ovocitos va a sufrir un descenso constante durante el resto de la vida de la mujer. Tras el nacimiento, dicha población de folículos primordiales comienza a descender de forma exponencial (alrededor de 1 – 2 millones), y persiste durante el resto de la vida, con unos 300000 – 500000 durante la pubertad, 25000 a los 37 años, hasta llegar a un número aproximado de 1000 folículos a la llegada de la menopausia (15–17).

Las mujeres en edad reproductiva van a presentar folículos en distinto estadio de crecimiento. Hay un continuo reclutamiento de estos folículos primordiales, para crecimiento hacia folículos de mayor estadio madurativo. Solo unos pocos son seleccionados hacia estadio preovulatorio, mientras el resto experimentan un proceso de atresia (14).

Desde los folículos primordiales, los folículos crecen a folículo primario y a folículo secundario o preantral, se desarrollan de forma independiente a la estimulación con gonadotropinas, y miden entre $<0.1 - 0.2\text{mm}$. Cuando estos folículos, comienzan a crecer, empezarán a ser sensibles a la expresión de gonadotropinas, hasta alcanzar la fase de folículo antral temprana (14).

Una cohorte de folículos preantrales será seleccionada en cada ciclo menstrual, dando lugar a los folículos antrales (2 – 5 mm de diámetro) que pueden ser vistos por ecografía, debido a su ecogenicidad y a su diámetro. Sin embargo, existen distintas teorías de como se reclutan estos folículos antrales, y el patrón de reclutamiento que siguen a lo largo de cada ciclo menstrual.

Algunas teorías más antiguas apoyan el reclutamiento continuo, independiente a la estimulación con gonadotropinas, o el reclutamiento de una cohorte única en cada ciclo menstrual (18). Actualmente, se apoya más la teoría de las “olas foliculares”, en donde se piensa que no solo hay un reclutamiento de folículos antrales en cada ciclo menstrual, si no que hay 2 o 3 oleadas o cohortes de folículos antrales reclutados en cada ciclo: una oleada en la fase folicular, una segunda en la fase lútea, y una posible tercera oleada en algunas mujeres a mediados-finales de la fase lútea. Un 68% de las mujeres van a presentar dos oleadas, mientras que un 32% presentaran 3 oleadas (14).

En las mujeres fértiles, un folículo antral será seleccionado de toda la cohorte para presentar un crecimiento preferente (aproximadamente alrededor del día 6- 9 del ciclo) y constituirá el “folículo dominante”, mientras que el resto de los folículos antrales se atresian. Este folículo dominante continúa creciendo hasta alcanzar un tamaño preovulatorio, en la fase folicular tardía (19–21).

Este proceso, desde folículo primordial, hasta su etapa de folículo preovulatorio, va a tener una duración de más 175 días, es decir, entre 5 – 6 meses (14).

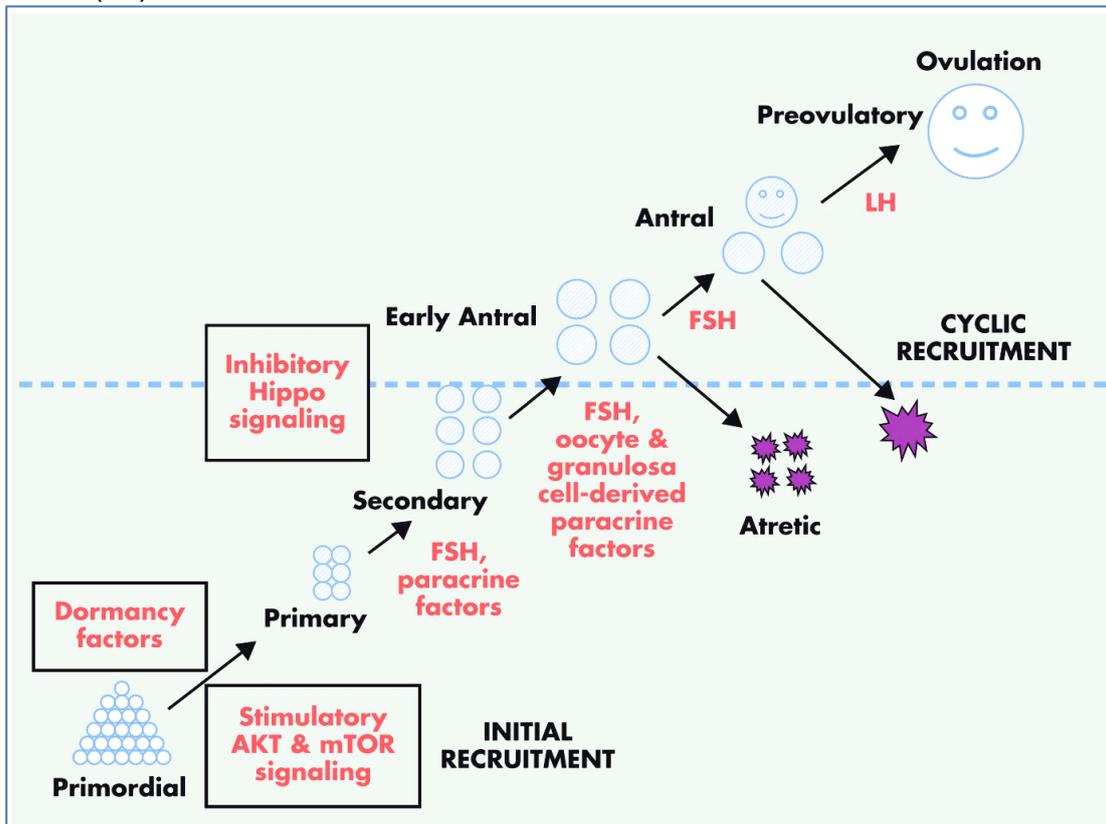


Figura 3: Foliculogénesis. Desde la fase de folículo primordial hasta la ovulación (22).

La FSH (*del inglés, follicle stimulating hormone*, u hormona foliculoestimulante) ha demostrado ser un factor indispensable en el reclutamiento folicular, así como su descenso natural determina la selección natural del folículo dominante. La foliculogénesis en ovarios sanos o tras una técnica de reproducción asistida (TRA), no va a depender únicamente de la estimulación por parte de las gonadotropinas de origen hipofisario (la LH, *del inglés, luteinizing hormone* u hormona luteinizante, y FSH), si no gracias a la liberación de factores solubles liberados por el ovario de forma paracrina y autocrina (prostaglandinas, hormonas esteroides, factores de crecimiento). Estos factores, en función de su expresión y acción, van a promocionar el crecimiento folicular, por un lado, o bien van a favorecer que otros folículos permanezcan quiescentes durante mucho tiempo (14,23).

Pero estos mecanismos operantes durante la vida reproductiva de la mujer comienzan a perder eficiencia con la edad (24). Como antes comentábamos, la fertilidad disminuye con la edad fundamentalmente porque la calidad de los ovocitos contenidos en los folículos que se van reclutando es deficiente, y da lugar a aneuploidías. Aunque es característico de todos los tejidos del organismo perder función y vitalidad con la edad, lo que sucede con el ovario es único ya que la pierde de forma bastante abrupta (en el arco de 5 años aproximadamente) y prematura (alrededor de los 45 años)(25).

A estas edades es muy complejo encontrar soluciones porque la calidad ovocitaria está muy dañada y se recurre con frecuencia a donación de ovocitos. ¿Podríamos hacer algo más? ¿Podríamos quizás detener el reloj biológico del ovario y que no perdiesen los ovarios ni cantidad de folículos ni calidad en los ovocitos en ellos incluidos?

Este es el reto que tenemos planteado. Mantener la cantidad de folículos o rescatar algunos folículos almacenados en el ovario que no pueden seguir los mecanismos de reclutamiento arriba descritos podría ser una estrategia interesante, pero sobre todo en la mujer joven que, por causas desconocidas, pierde todavía a una edad más temprana la fertilidad, lo que conocemos como insuficiencia ovárica prematura (*del inglés premature ovarian insufficiency* o POI), o menopausia prematura o precoz. Por que, al menos en teoría, en esas mujeres la edad no ha dañado la calidad de esos ovocitos (10). En definitiva, tenemos quizás pocos folículos todavía en los ovarios que serían rescatables, pero que en teoría sus ovocitos podrían ser buenos.

Pero el reto sería encontrar soluciones que detuvieran el reloj biológico, que sirvieran para toda la población, que alargaran la edad reproductiva de una mujer. En este sentido debemos volver a la fisiología y centrarnos en dos hormonas cuyo papel hemos descrito sucintamente en párrafos anteriores.

Una de ellas es la hormona Antimülleriana (AMH). Experimentos realizados por Kano et al., demostraron que el uso de AMH exógena consigue detener el efecto deletéreo de la quimioterapia manteniendo los animales una población de folículos preantrales y antrales importante (26).

De igual modo, la LH podría ser otra hormona que ensayar como potencial moduladora del reloj biológico del ovario. Los experimentos llevados a cabo en la Universidad de Tor Vergata en Roma y la Fundación IVI en Valencia, demuestran que su administración tiene efectos protectores de la destrucción de folículos primarios y preantrales como consecuencia de la quimioterapia de modo semejante a la AMH (Rossi et al., 2017). Ambas son claves en esta historia, pero no son el objeto de esta Tesis Doctoral (27).

Sin embargo, otros procedimientos que puedan rescatar los folículos primordiales adormecidos que una mujer pueda tener cuando se presenta ante nosotros con una insuficiencia ovárica, si que son parte del objetivo de esta Tesis. Es la curación, y no la prevención como el uso de AMH o LH. Pero es lo que nos encontramos a diario en la clínica.

La AMH es, además un estupendo marcador de la reserva ovárica al ser sintetizada por las células de la granulosa de los folículos preantrales (mayoritariamente), y antrales. Por ello el valor de AMH se relaciona proporcionalmente con el número de folículos en desarrollo, es decir, directamente con la reserva ovárica. Como ventajas de esta, se puede contabilizar sin interferencia inter-observador y permite establecer rangos de referencia para distintas edades (28).

En la actualidad, para estimar la reserva ovárica y para predecir la respuesta ovárica ante una estimulación ovárica controlada (EOC), se utiliza también el recuento de folículos antrales (*del inglés Antral Follicle Count o AFC*) de entre 2 y 10 mm al comienzo del ciclo, junto a la hormona AMH. Ambos biomarcadores se recomiendan sobre otros marcadores de reserva ovárica, puesto que tienen una elevada precisión en predecir la respuesta ante una EOC, no solo en pacientes con baja respuesta ovárica, si no también con respuesta moderada y elevada (29).

Históricamente se han utilizado otros parámetros como marcadores de reserva ovárica. Entre ellos se encuentran la edad de la paciente, la concentración de hormonas al inicio del ciclo (FSH, LH, estradiol, inhibina B), e incluso pruebas dinámicas (citrato de clomifeno, etc.)(30). Pero en la última década, la evidencia apoya el uso de AFC y AMH.

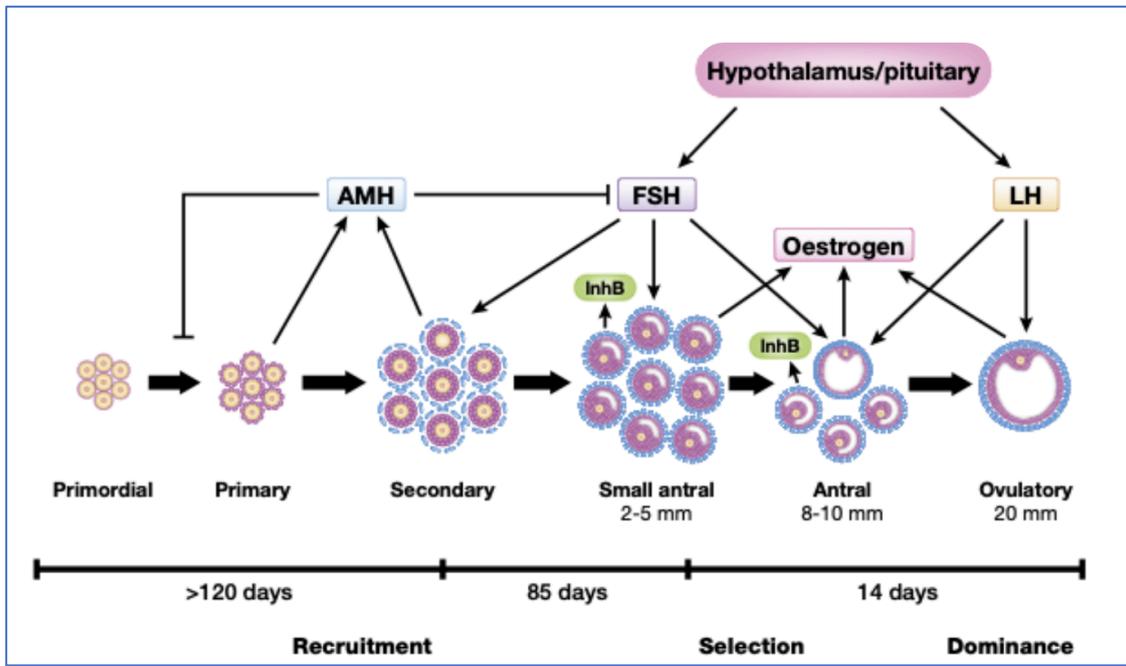


Figura 4: La AMH como marcador de la reserva ovárica. Es un buen marcador de la reserva ovárica, ya que presenta muy pocas fluctuaciones intra- e inter-cíclicas. Se relaciona con la regulación de la maduración de los folículos primordiales, pues previene su agotamiento prematuro. En la maduración desde folículo secundario a folículo antral, es donde encontraremos la máxima expresión y concentración de AMH (28).

La reserva ovárica varía, como hemos mencionado en repetidas ocasiones, con la edad. Pero puede disminuir entre mujeres con la misma edad y ser un factor de peor pronóstico, pues en general cuántos más ovocitos tengamos, más posibilidades de tenerlos euploides (31).

Existen dos grupos de pacientes que van a ver su fertilidad disminuida de forma precoz: estas son las pacientes con Baja respuesta ovárica” (del inglés *Poor Ovarian Response/Responders* o POR), y la insuficiencia ovárica precoz o prematura (POI) y ambas son objeto de esta Tesis Doctoral.

1.3. POR: *Poor Ovarian Response/Responders* o Baja Respuesta Ovárica

Las mujeres con POR presentan una respuesta disminuida ante una EOC, debido a su baja reserva ovárica. Existen muchos términos para definir este concepto.

El término POR se describió por primera vez en 1983 por García et al (32). Desde entonces, los expertos han tratado de llegar a un consenso, para hallar criterios que mejor definan el término de POR. En 2010 se llegó a un consenso en el “ESHRE Campus Workshop de Bolonia”, en el cual participaron expertos que más habían investigado sobre este tema (33).

Se considera una POR cuando se cumplen al menos dos de los tres criterios siguientes: edad materna avanzada (igual o mayor a 40 años) o la presencia de factores de riesgo para presentar POR (tratamiento gonadotóxico, etc...), un ciclo previo con POR (3 o menos ovocitos obtenidos con un protocolo convencional), una reserva ovárica disminuida (AFC menor de 5 u hormona AMH menor de 0.5 – 1.1 ng/ml). Además, se considera que, en ausencia del primer y tercer criterio, dos episodios de ciclos de EOC con una respuesta pobre o subóptima, son suficientes como para diagnosticar a una paciente como POR. Según esta definición, la prevalencia de paciente con POR va a estar en un rango entre un 8.1% y un 39.1% (34).

No obstante, esta clasificación lleva a problemas en el manejo clínico, pues agrupa a pacientes biológicamente muy dispares en el mismo grupo, cuyo manejo en la clínica podría requerir estrategias diferentes ya que, a parte del número de ovocitos obtenidos, también va a jugar un papel muy importante la calidad ovocitaria, que depende fundamentalmente de la edad de la paciente. Por ello en 2016 se propuso una nueva clasificación, haciendo referencia a los criterios de Bolonia previos. Esta nueva clasificación recibió el nombre de “grupo POSEIDON”. El primer grupo de pacientes serán menores de 35 años con una reserva ovocitaria previa a la estimulación ovárica normal (AFC igual o mayor de 5 y AMH igual o mayor de 1.2 ng/mL) que posteriormente tienen una respuesta ovárica inesperadamente subóptima o pobre tras una EOC. El segundo grupo correspondería a pacientes igual o mayores de 35 años también con una reserva

ovocitaria preestimulación normal (AFC igual o mayor de 5 y AMH igual o mayor de 1.2 ng/mL), pero que, de la misma forma, tienen inesperadamente una respuesta pobre o subóptima tras una EOC. El tercer grupo son pacientes jóvenes (por debajo de 35 años), con reserva ovárica disminuida previo a iniciar el ciclo (AFC menor de 5 y AMH menor de 1.2 ng/mL). Y finalmente del cuarto grupo son las pacientes de mayor edad (mayores o igual a 35 años), con reserva ovárica disminuida (AFC menor de 5 y AMH menor de 1.2 ng/mL)(35).

Característico de estas pacientes POR, es la elevación premenstrual de FSH, ya que al tener inferior número de folículos antrales, presentan una menor producción de inhibina B y estradiol. Esto conlleva una menor supresión de la FSH en esta transición de fase lútea a fase folicular, que ocasiona un reclutamiento folicular temprano en fase lútea, y que como consecuencia genera una falsa elevación de estradiol. Con ello, estas pacientes comienzan la fase folicular del ciclo con un reclutamiento folicular ya establecido; esto es, con un folículo preovulatorio ya reclutado. Esto por tanto va a dificultar aún más el manejo durante el ciclo de EOC, no permitiendo un reclutamiento de folículos antrales de forma sincrónica (33).

Durante las últimas décadas, los expertos han investigado sobre la EOC idónea para este tipo de pacientes. Se han propuesto numerosos protocolos, con tipos y dosis de hormonas diferentes, pero ninguno de ellos ha resultado ser realmente efectivo. Estas pacientes continúan teniendo pobres resultados reproductivo, a pesar de nuevos e innovadores protocolos. Por todo ello, hoy en día, las pacientes con POR se consideran un reto en el manejo en una consulta de reproducción asistida.

Múltiples estudios han demostrado que el aumento de dosis de gonadotropinas durante la EOC no es una estrategia efectiva en estas pacientes. Aumentar la dosis de FSH de 150 UI a 300 UI, o de HMG a 600 UI diarios no conlleva un aumento de los ovocitos ni de embriones obtenidos, de la tasa de gestación, ni de la tasa de recién nacido vivo. Esto es consecuencia fundamentalmente a la disminución de folículos antrales que presentan estas mujeres, y con ello, una reducción de los receptores de FSH, y por consiguiente, la incapacidad de responder correctamente la estimulación con FSH (36).

Es más, se postula que el uso de protocolos “mild” (*del inglés*, suaves), pese a que no hay suficiente evidencia científica que las tasas de gestación sean superiores al protocolo habitual, permiten el uso de menores dosis de medicación, siendo así mejor tolerados por las pacientes (37).

Los agonistas de la GnRH también han sido utilizados como coadyuvantes en los protocolos de la inducción de la ovulación, y su manipulación ha sido adaptada a las pacientes POR. Un protocolo que tuvo bastantes adeptos fue denominado mini-flare-up con administración de agonistas de la GnRH desde el segundo día del ciclo menstrual (en fase folicular), iniciando las gonadotropinas con un mínimo retraso (38).

También se han utilizado muchos otros coadyuvantes, desde los andrógenos a la hormona del crecimiento. Respecto a los andrógenos, existe la hipótesis de que los andrógenos a nivel intraovárico favorecen el crecimiento folicular. Existen receptores androgénicos en los folículos en crecimiento, que tienen un papel importante en el crecimiento folicular, independientes a la fase del ciclo menstrual y al efecto de las gonadotropinas.

Se ha investigado sobre la testosterona transdérmica y la DHEA (deshidroepiandrosterona) como terapias adyuvantes en pacientes con POR. Una revisión y metaanálisis reportó tasas de gestación superiores y una reducción de la dosis de gonadotropinas utilizadas, cuando la testosterona transdérmica se administra previo a la EOC (39,40).

Además, existen datos en la literatura acerca del uso de testosterona en el ciclo anterior a la EOC, para aumentar la respuesta en POR, que sugieren un aumento de la tasa de recién nacido vivo. No obstante los resultados no son firmes (41).

Otro ensayo clínico estudió el tratamiento con testosterona transdérmica junto con un protocolo corto con antagonistas de la GnRH, o junto a un protocolo largo con agonistas de la GnRH. No demostraron diferencias significativas en función de la GnRH utilizada, pese a que se propone como terapia adyuvante válida en pacientes con POR (42).

Por otro lado, se ha sugerido el uso de inhibidores de la aromatasa, como letrozol en la EOC. El letrozol bloquea el paso de andrógenos a estrógenos, produciendo consecutivamente un descenso de los niveles estrogénicos circulantes y androgenización indirecta (43). Pero los resultados, como con otros adyuvantes, no son consistentes (44,45).

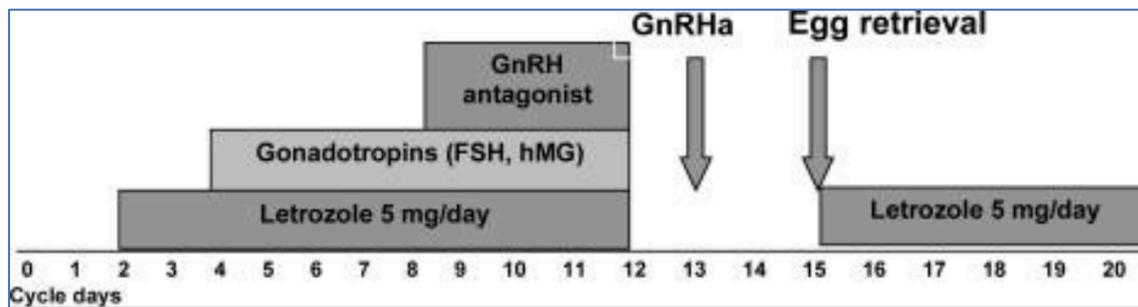


Figura 5: EOC con gonadotropinas y letrozol (46).

El uso de la hormona de crecimiento como terapia coadyuvante, ha ganado popularidad durante esta última década. Se sospecha que la hormona de crecimiento podría tener un efecto potenciador sobre las gonadotropinas. La hormona de crecimiento va a aumentar la síntesis del IGF-1 (*del inglés, insulin-like growth factor*). Como consecuencia, el IGF-1 va a amplificar la FSH sobre las células de la granulosa y de la teca.

La efectividad de esta terapia también ha creado debate. Pese a que numerosos estudios han demostrado un aumento del número de ovocitos, no se ha probado un aumento de la tasa de recién nacido vivo, objetivo final en la reproducción asistida. Por tanto, actualmente no existe indicación clara en el uso de esta hormona como terapia coadyuvante: algunos expertos usarían esta hormona en su práctica clínica diaria, mientras la mayoría no lo harían. El uso de la hormona de crecimiento en fase lútea tampoco ha demostrado beneficios en pacientes con POR (38,47,48).

Otras terapias coadyuvantes, pretenden disminuir los niveles elevados de FSH que antes mencionábamos como característicos de estos pacientes POR. Se ha utilizado el 17 β -estradiol (desde el día 20 del ciclo previo a la EOC hasta

el día 2 de la menstruación)(49), anticoncepción hormonal combinada los dos ciclos previos a EOC, u progesterona, para suprimir el pico prematuro de FSH característico en la fase lútea de las pacientes con POR (50).

Marzal et al. compararon el tratamiento en el ciclo previo con estradiol, con anticonceptivos hormonales combinados y con testosterona transdérmica. Se observó una mejora de la respuesta ovárica en los tres protocolos, sin poder demostrar una superioridad en ninguno de los tratamientos, en cuanto a mejora de los resultados reproductivos (51).

Otra estrategia de EOC destinadas en pacientes con POR completamente diferente es la denominada “Minimal ovarian stimulation” (MOS), o con efecto de esta tesis doctoral, también llamado “protocolo japonés”. Dado que muchos de los tratamientos previamente descritos han resultado ser inefectivos, junto con un malgasto innecesario de dinero y recursos, dicha estrategia trata de reducir las dosis administradas en este tipo de pacientes, cuyo resultado reproductivo final se prevé similar tanto con altas como de bajas dosis de hormonas utilizadas. Se ha propuesto ello la incorporación del citrato de clomifeno vía oral con efecto antiestrogénico para la estimulación (que tiene un bajo precio comparado con las gonadotropinas de administración subcutánea), combinado con HMG o FSH días alternos (52).

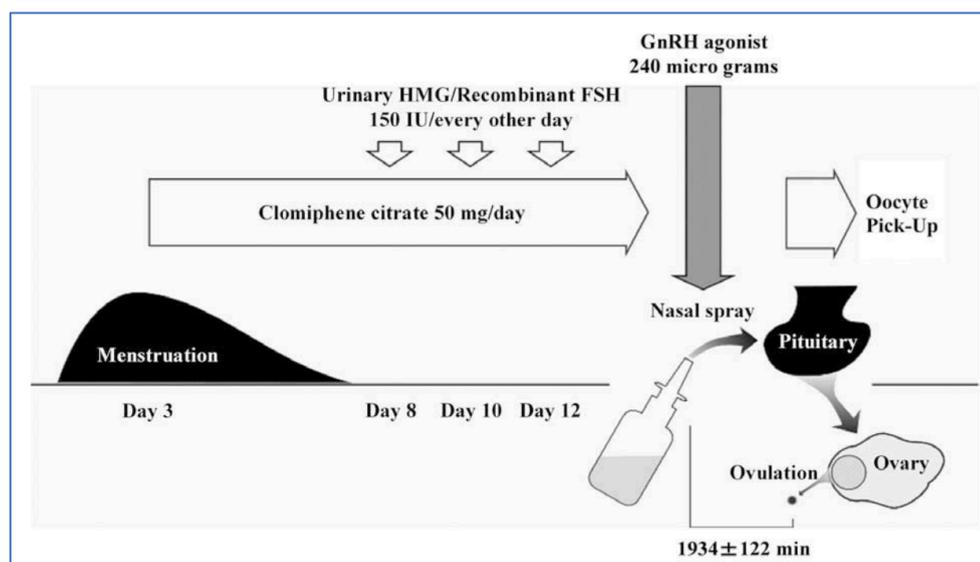


Figura 6: Protocolo EOC con citrato de clomifeno (MOS) (52).



El citrato de clomifeno actúa como antagonista del receptor del estradiol a nivel hipotalámico, inhibiendo tanto la retroalimentación positiva como negativa. Esto conlleva una estimulación ovárica, junto con una inhibición de la ovulación. Por este motivo, el tratamiento con citrato de clomifeno debe administrarse desde el primer día de estimulación (50 mg diarios vía oral) hasta el día de la inducción de la ovulación inclusive, y posteriormente suplementarse con 150 mg de FSH o HMG días alternos desde el cuarto día de estimulación. Dicha estimulación con citrato de clomifeno, se comienza 3 días tras el cese de anticonceptivos, confirmando mediante un examen analítico una FSH sérica inferior a 8.0 IU/l. La primera ecografía se lleva a cabo el día 7 de estimulación. Como inducción de la ovulación se utiliza el agonista de la GnRH (53).

Este protocolo ha demostrado una tasa de gestación acumulada superior en pacientes normo-respondedoras, en comparación con los protocolos largos con agonistas de la GnRH. En POR, ha demostrado ser un tratamiento efectivo para la acumulación de ovocitos y embriones. Gracias al menor coste del tratamiento farmacológico, este protocolo permite un mayor número de ovocitos y embriones euploides acumulados, resultando por tanto más fácil realizar ciclos consecutivos y con una menor tasa de abandono por parte de las pacientes. No obstante, la tasa de gestación y recién nacidos vivos no puede ser comparada con otros protocolos, ya que los ovocitos y embriones son criopreservados con el fin de ser acumulados, en vez de ser transferidos (53,54).

Finalmente, otra estrategia diferente es tratar de acumular ovocitos, básicamente si hay pocos, estimulando varias veces para alcanzar nuestro objetivo. La primera aproximación fue popularizada con el nombre de “accuvit” y consistió en aprovechar la implementación de la vitrificación de ovocitos para tener más ovocitos y embriones a disposición (55). Dicha estrategia consiste en la acumulación ovocitaria en ciclos consecutivos, previo a la transferencia embrionaria, en pacientes con una baja respuesta ovocitaria. Para ello se realizaron como mínimo 3 ciclos consecutivos en cada paciente, dejando al menos un ciclo menstrual entre ciclo y ciclo. El objetivo es por un lado lograr una mayor población de ovocitos reclutados, y, por otro lado, disminuir la tasa de pacientes que abandonan los tratamientos de reproducción asistida como

consecuencia de los malos resultados que obtienen debido a su baja reserva ovárica. Como resultado a esta estrategia, se consigue una menor tasa de abandono del tratamiento con un aumento de la tasa de recién nacido vivo. No obstante, se trata de una estrategia costosa (55).

Más recientemente, se propone la “doble estimulación” en un mismo ciclo, aprovechando las distintas oleadas de reclutamiento folicular de las que hablábamos antes (56). El reclutamiento folicular en fase lútea, fue descrito por primera vez en 1998 (57). Otros investigaron la posibilidad de iniciar un segundo reclutamiento folicular en la fase lútea consecutiva del mismo ciclo menstrual (doble estimulación), al contrario de lo que hicieron Romauts et al. (en la fase lútea del ciclo previo). La doble estimulación en POR y posterior criopreservación de embriones, podría aumentar el número de ovocitos obtenidos, blastocistos, y con ello mejorar el resultado reproductivo (58).

Otros ensayos, manifiestan que la técnica de “doble estimulación”, no aumenta el número de blastocistos obtenido ni la tasa de gestación ni RNV. No obstante, si que va a proporcionar una disminución de la tasa de abandono de FIV, y por tanto su uso puede estar justificado (59,60).

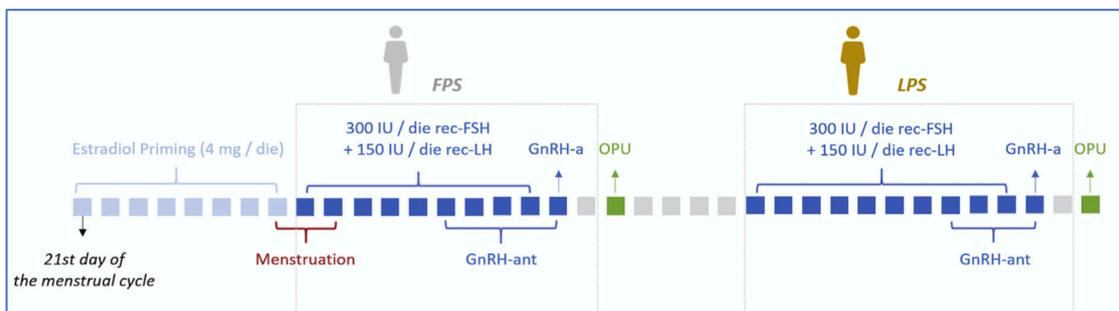


Figura 7: Protocolo de doble estimulación. Se observa una primera estimulación en fase folicular tras tratamiento previo con estradiol (FPS, o follicular phase stimulation en inglés). Posteriormente, tras la punción folicular (OPU, del inglés oocyte pick-up), una segunda estimulación inmediata en fase lútea (LPS, del inglés, luteal phase stimulation) (60).



1.4. POI: *Premature ovarian insufficiency* o *Insuficiencia ovárica prematura*

La POI fue descrita por primera vez en 1942, pero desde entonces ha recibido numerosas terminologías, entre ellas menopausia precoz o prematura, fallo ovárico precoz, amenorrea hipergonadotropa o hipogonadismo hipergonadotrófico. La POI es una patología de mayor gravedad que el POR, pues no solo genera alteraciones a nivel reproductivo e infertilidad, si no también sintomatología menopáusica y las consecuencias a largo plazo que ésta conlleva, teniendo mayor trascendencia por su comienzo a temprana edad (61).

Se define como la pérdida de función ovárica por debajo de los 40 años, y se caracteriza por una alteración del patrón menstrual, ligado a alteraciones hormonales (FSH >25 UI/L con una disminución del estradiol <60 pg/ml). La POI tiene una prevalencia aproximadamente del 1 -4 % de mujeres en la edad fértil, pese a que la incidencia puede variar en función de la etnia. Adicionalmente, la incidencia no es homogénea en todos los grupos de edad, alcanzando el pico máximo en menores de 40 años, posteriormente de 1/1000 en mujeres menores de 30 años, y de 1/10000 en menores de 20 años (16).

La causa de la POI es hasta en un 63% desconocida. En otras circunstancias, la causa es conocida, como el caso de los síndromes autoinmunes (1%), infecciones tales como VIH, herpes zoster, parotiditis, etc., síndromes metabólicos (galactosemia, etc.), o formando parte de un síndrome genético (el síndrome de X frágil) o alteración cromosómica (monosomía X o síndrome de Turner)(16). También puede deberse a factores iatrogénicos, como consecuencia de tratamientos gonadotóxicos (quimioterapia), cirugías agresivas sobre la pelvis femenina, o radiación pélvica (62).

La clínica en la POI va a aparecer como consecuencia de la interrupción de la función ovárica. El síntoma más inquietante y por el que principalmente van a consultar las pacientes, es la amenorrea u oligoamenorrea (ausencia de menstruación o menstruaciones poco frecuentes). No obstante, lo que muchas veces motiva a la consulta, es también la esterilidad. Además, también presentarán síntomas derivados del hipoestrogenismo, tales como sofocos, insomnio, distrés emocional, disminución de la concentración, disminución de la

libido, y sequedad o atrofia vulvo-vaginal. A largo plazo, si el hipoestrogenismo no se trata debidamente con terapia hormonal sustitutiva (THS) para reestablecer los ciclos menstruales, puede aparecer osteoporosis y enfermedad cardiovascular (63).

Actualmente existe una subclasificación de la POI, dependiendo de la clínica, los valores de FSH, y del grado de esterilidad. Por un lado, se encuentra la POI fluctuante, en donde la FSH sufre variaciones y alcanza rangos postmenopáusicos o valores de normalidad, lo que conlleva menstruaciones ocasionales o “spotting”. Por último se encuentra la POI verdadera o irreversible, en donde se dan todas las manifestaciones de la patología: aumento de la FSH, oligo/amenorrea, y alteraciones de la fertilidad (16,64).

Las mujeres con POI tienen una tasa de gestación espontánea muy baja, del 4.4%(61,65,66). Por eso, se han intentado a lo largo de los años diseñar estrategias para estimular esos ovarios, que difieren poco de algunas de las utilizadas en mujeres POR. Las estrategias, han consistido en bajar los niveles elevados de FSH con estrógenos o con GnRH α y posteriormente esperar ovulaciones espontáneas o estimular con gonadotrofinas. La experiencia es decepcionante (67–69).

Recientemente, se describió cómo solamente aquellas mujeres capaces de bajar los niveles de FSH en torno a 25 mIU/ml eran capaces de ovular, lo que en definitiva vuelve a identificar al POI fluctuante con mejor pronóstico que el POI verdadero, donde la FSH es muy elevada (70).

Por todo ello, el tratamiento de fertilidad en las pacientes con POI, la única opción válida actualmente, dada la disfunción del ovario que presentan, va a ser la donación de ovocitos o embriones, o la adopción. Pero muchas mujeres, debido a causas religiosas, éticas o culturales, no admiten la ovodonación como terapia.

1.5. El concepto de “rescate ovárico”

En realidad, si se practica una biopsia ovárica a las mujeres con POI, en el 9% de ellas se encuentran muchos folículos primordiales y en el 30% algunos folículos primordiales (69). De ahí la existencia de embarazos espontáneos o tras alguna terapia con EOC (65). Estudios de grupos que mantienen la capacidad de estudio de gran número de estas pacientes, muestran que las mujeres con POI verdadero, tienen una capacidad de embarazo espontáneo del 4.4%, mientras que aquellas con POI fluctuante lo tienen en el 17.5% (66).

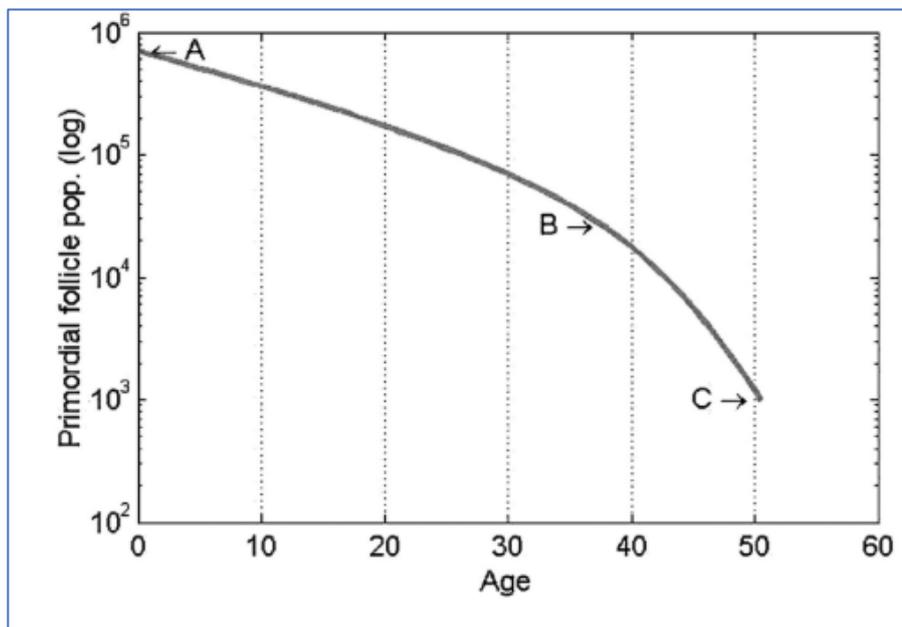


Figura 8: Población de folículos primordiales, desde el nacimiento hasta la menopausia (71).

La teoría es, pues, que tanto en las mujeres con POR como POI, e incluso menopausia establecida, van a permanecer un número residual de folículos primordiales quiescentes (71). Estos folículos pueden ser rescatados y presentan capacidad de desarrollo, aumentando así el conteo final de ovocitos obtenidos, si se proporciona un ambiente ovárico adecuado que favorezca este crecimiento.

De esta forma, están surgiendo nuevas investigaciones, que promueven la creación de un ambiente que estimule y favorezca el crecimiento de folículos de novo, de forma que el reclutamiento de ovocito final tras un ciclo de FIV sea mayor que el esperado previo al tratamiento. Existen distintas técnicas que buscan proporcionarle al ovario un ambiente favorecedor para reactivar los folículos primordiales quiescentes, las más exploradas han sido la denominada “in-vitro activation” (IVA) y el uso de plasma rico en plaquetas (72).

Kawamura et al. (2013) fueron los primeros en explorar el concepto del rescate del ovario(73). Describieron cómo, la fragmentación del ovario mecánica en pequeños fragmentos convertía las fibras de G-Actina en F-Actina. Esta, a su vez, inhibe la una vía de señalización denominada genéricamente “Hippo”. Sus genes modulan la regulación de la proteína YAP (*del inglés, yes associated protein*), que por lo general está fosforilada y no actúa como activadora intranuclear. Pero si la vía Hippo se interrumpe, YAP favorece crecimiento celular e inhibición de la apoptosis. Así se cree que la fragmentación ovárica pueda estimular la foliculogénesis.

El grupo de Kawamura (73) propuso la fragmentación in vitro de la vía Hippo, para lograr su inhibición, con posterior tratamiento farmacológico con PI3K (*del inglés, “phosphatidylinositol 3-kinase”*), para estimular la vía de señalización Akt, y con ello lograr la reactivación de los folículos primordiales quiescentes del ovario.

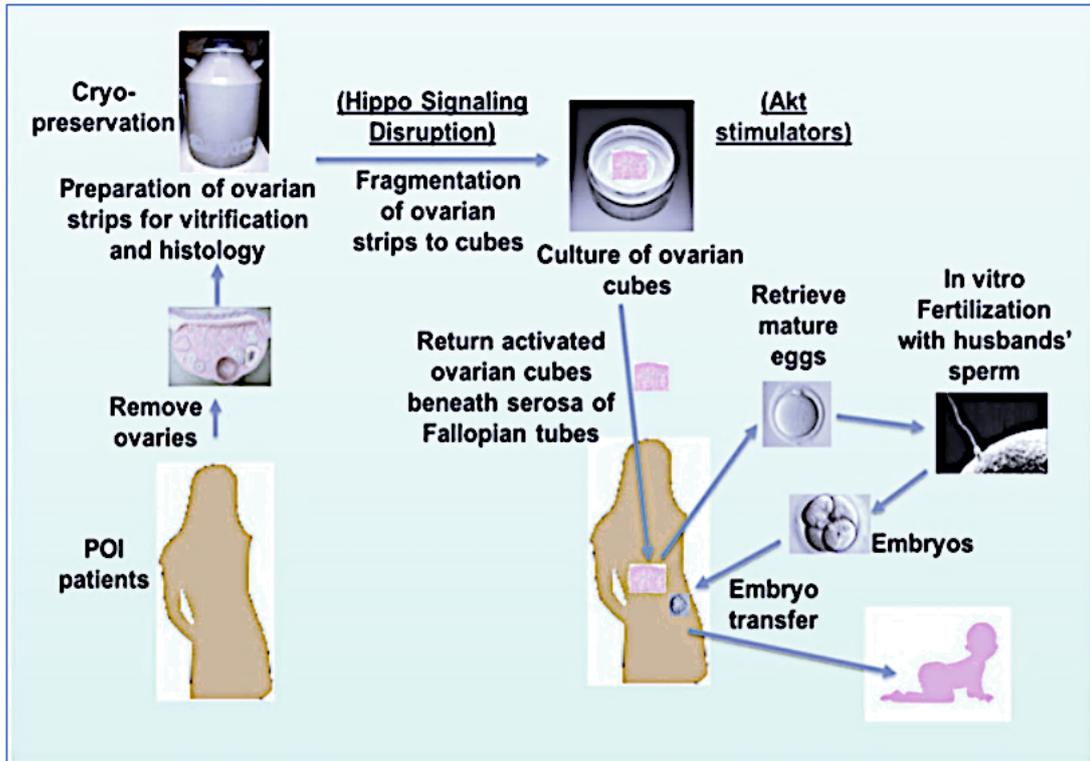


Figura 9: Procedimientos realizados por el grupo de Kawamura. Fragmentación de la vía Hippo y activación de la vía Akt (73).

Se evidenció un crecimiento folicular en un 50% de las pacientes, pocas semanas o meses después del trasplante. Lo que llamó la atención fue el crecimiento folicular evidenciado 6 meses después del tratamiento. La teoría es que el primer crecimiento folicular evidenciado procedía de los folículos secundarios, como respuesta a la interrupción de la vía Hippo. Sin embargo, el segundo crecimiento folicular correspondería con la estimulación y activación de los folículos primordiales quiescentes del ovario. Gracias a esta técnica se lograron 3 gestaciones, con dos recién nacidos vivos (74).

Suzuki et al. (2015) realizaron el procedimiento IVA en 37 pacientes con POI. La respuesta al tratamiento IVA era mayor cuanto menos tiempo había pasado desde el diagnóstico de POI hasta la realización de la ooforectomía. Tras análisis histológicos, llegaron a la conclusión de que era consecuencia a una mayor proporción de folículos primordiales presentes en las pacientes con reciente diagnóstico de POI, que iban en descenso conforme aumentaba el tiempo desde el diagnóstico (75).

Otro grupo de investigación realizó el mismo procedimiento IVA realizado por Kawamura et al. con 14 pacientes con POI (76). Los fragmentos de corteza ovárica fueron retransplantados vía laparoscópica, 2 días tras cultivo con PTEN (*del inglés, "phosphatase and tensin homolog"*) y PIK3. Se evidenció un crecimiento folicular tras IVA en un 43% de las mujeres tratadas.

Tras los resultados esperanzadores de Kawamura en pacientes con POI, en 2018 realizaron un nuevo ensayo en 17 pacientes con POR (77). A dichas pacientes se les realizó una excisión vía laparoscópica de la corteza ovárica de uno de los dos ovarios. La tasa gestacional tras el IVA ascendió de un 2.2% a un 7.5%.

Así mismo, el grupo de Kawamura, realizó la técnica IVA de nuevo en 79 pacientes con POI, esta vez sin activación de la vía Atk. Evidenciaron una tasa de gestación post intervención del 18.4% (previa 3.7%) (78).

Fabregues et al. reportaron en la literatura un caso de gestación evolutiva tras realizar la técnica IVA descrita por Kawamura, en una paciente de 32 con POI. Tras la fragmentación de la corteza ovárica, este grupo de investigación retransplantó en el mismo acto quirúrgico los fragmentos ováricos, o bien en el ovario contralateral o creando un bolsillo peritoneal (79).

En 2019, Andersen et al. realizaron un nuevo ensayo clínico con la técnica IVA, en 20 pacientes con una disminución de la reserva ovárica. Llevaron a cabo 4 biopsias por vía LPS en uno de los dos ovarios, y reimplantaron estas biopsias de ovario previamente fragmentadas en la serosa peritoneal. Tras ello, reportaron 12 gestaciones clínicas, siendo 3 de las mismas gestaciones espontáneas (80).

1.6. Las células madre adultas

En los últimos años, ha despertado especial interés, la terapia con células madre adultas, con potencial de proporcionar el ambiente adecuado para el desarrollo ovocitario a partir de los folículos primordiales quiescentes. Este sería

el marco idóneo en pacientes con la función ovárica alterada, tales como las pacientes con POR y POI.

Las células madre pueden diferenciarse en tres grupos. Por un lado, están las células madre embrionarias, que derivan a partir del blastocisto embrionario, y que tienen la cualidad de ser pluripotentes, es decir, que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier célula de cualquier tejido. Por otro lado, están las células madre adultas. Las células madre adultas se encuentran en los tejidos y órganos de los seres humanos (desde el feto hasta el adulto), y poseen la capacidad de diferenciarse para dar lugar a células adultas del tejido en el que originalmente se localizan. Se han identificado hasta ahora alrededor de 20 tipos distintos de células madre adultas, que son las encargadas de regenerar los tejidos en continuo desgaste (81). Finalmente encontramos las células madre pluripotentes inducidas (*iPS*, del inglés, *induced pluripotent stem cells*), que son células humanas del adulto manipuladas para generar células embrionarias con pluripotencialidad inducida (81).

Las células madre se caracterizan por su capacidad de diferenciación y auto-regenerativa. Entre sus funciones tienen la cualidad de reparar los tejidos dañados, mientras que parte de la descendencia de células madre va a dar lugar a nuevas poblaciones de células madre, para asegurar una población mantenida a largo plazo (82).

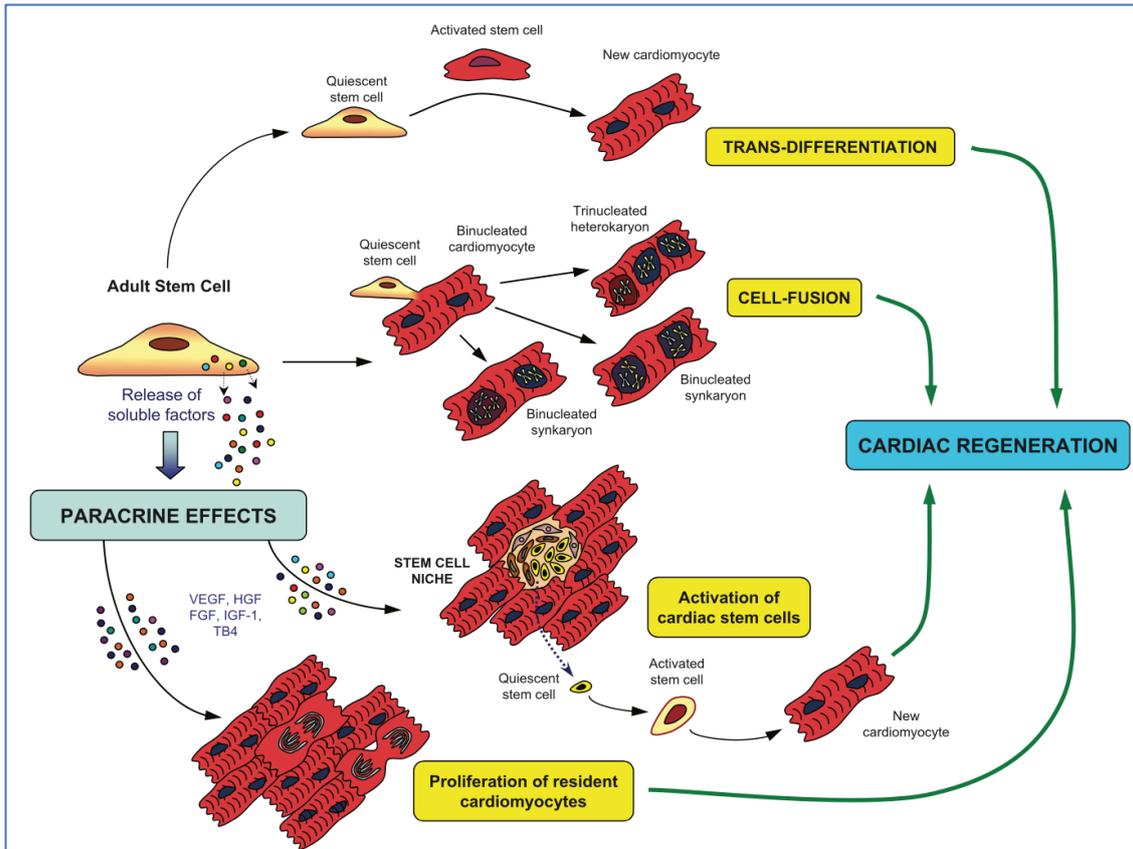


Figura 10: Efectos de las células madre sobre la regeneración cardiaca (82).

En el cuerpo humano, los distintos órganos y tejidos van a presentar una proporción distinta de células madre adultas, dependiendo de su recambio celular. En tejidos con un recambio celular elevado, como el caso de la médula ósea o el intestino, la población de células madre es elevada, y suelen estar activas durante toda la vida. De esta forma están disponibles para la reparación de estos tejidos con gran demanda. Existen otros tejidos con un recambio celular inferior, y en donde dichas células madre permanecen de forma quiescente y son únicamente activadas ante una agresión (ej. el músculo)(83).

En cuanto a las células madre adultas, ha cobrado mucha relevancia la investigación con células madre adulta de origen hematopoyético y de origen mesenquimal (84). Las células madre hematopoyéticas, son relativas al origen de la sangre. Las células madre de origen mesenquimal, relativas al tejido celular, tienen una capacidad de replicación muy elevada. Por otro lado,

presentan potencial de diferenciarse cuando son cultivadas in vitro a otras células, tales como osteocitos, adipocitos, y condrocitos.

En el ámbito de la medicina reproductiva, las células mesenquimales que han sido utilizadas previamente son procedentes de líquido amniótico, de sangre de cordón umbilical, de tejido adiposo autólogo, y de médula ósea.

No obstante, no todas las fuentes de células madre mesenquimales, van a tener un origen autólogo, como sería el caso de las células de cordón umbilical y las de líquido amniótico. Dichas células suelen ser de origen alogénico. Esto limita el uso en pacientes con POR y POI, ya que la probabilidad de que estas mujeres presenten sangre de cordón umbilical autóloga congelada, o líquido amniótico de una gestación propia, es muy improbable. De tal forma, se han investigado también otras fuentes de obtención de células mesenquimales, que ofrezcan la posibilidad de obtener posteriormente una fuente autóloga, tales como el tejido adiposo y la médula ósea.

En la médula ósea, además de las células madre de origen mesenquimal, se pueden encontrar células madre hematopoyéticas, y endoteliales (85,86).

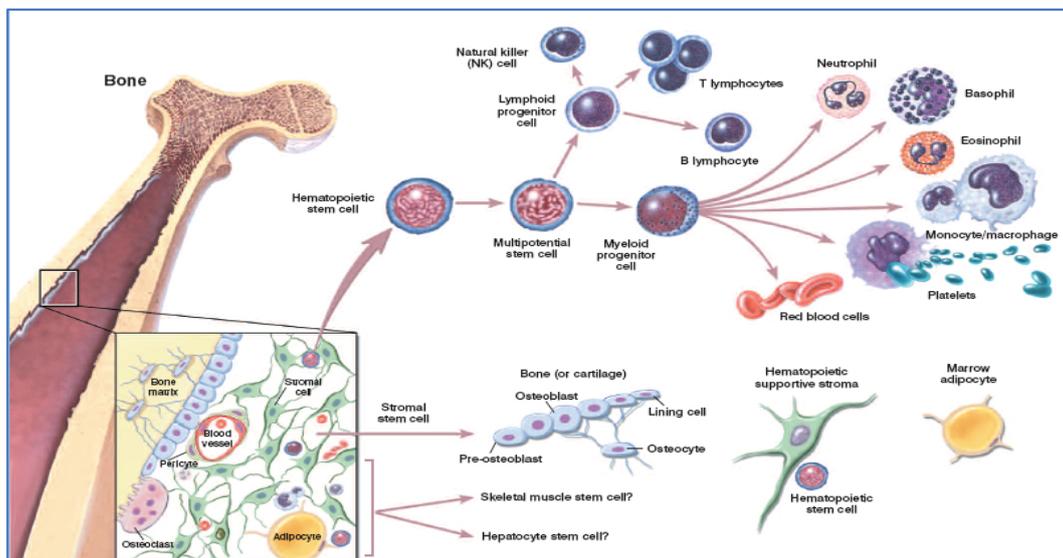


Figura 11: Tipos de células madre adultas y progenitoras derivadas de médula ósea. Imagen modificada de *Stemcells.nih.gov* (© 2008 Terese Winslow)

Las células mesenquimales de la médula ósea son solo una baja proporción del total de células. Para poder ser utilizadas como terapia, deben de ser aisladas del resto de células madre, y cultivadas posteriormente *in vitro*. Esta manipulación celular presenta un riesgo potencial de pérdida de las cualidades regenerativas de las células (87).

Gracias a los avances en la medicina actual, existe la posibilidad de administrar el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF, *del inglés, granulocyte colony stimulating factor*), también utilizado en donantes de médula ósea para enfermedades hematológicas. Este fármaco permite la movilización a sangre periférica de toda la población de células de células madre, para ser recolectadas posteriormente mediante aféresis, siendo una técnica mucho menos invasiva que la punción de la cresta iliaca (método previamente utilizado en donantes de médula ósea). Además, permite la recolección inmediata celular, sin necesidad de cultivo celular posterior, y por tanto disminuyendo el riesgo de perder las cualidades regenerativas (88).

Las funciones ejercidas por las células madre, al igual que la quiescencia, la proliferación, multipotencia, o diferenciación, van a ser mediadas por señales extracelulares que alcancen las células madre. Mencionadas señales, pueden proceder o bien del ambiente sistémico, o bien de un “nicho” concreto con un ambiente local. Se considera un “nicho” cualquier tejido, célula, o matriz extracelular que está en contacto con una población de células y que de alguna forma tiene una influencia sobre las mismas (83).

Las células madre van a ofrecer un ambiente apropiado para regenerar cada nicho, gracias a la liberación paracrina de factores solubles: citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, etc.(82).

Gracias a esta teoría, durante las últimas décadas, las células madre han ganado mucho protagonismo en el campo de la investigación, fuera del ámbito de la reproducción humana (82). Ha sido estudiado su utilidad como terapia en patologías degenerativas y neurodegenerativas. Así mismo, el uso de células madres se ha investigado en la reparación cardíaca, tras una lesión, como podría

ser el infarto agudo de miocardio (89), en la reparación de las lesiones de la médula espinal, en la cirrosis hepática, etc. (90).

1.7. El ovario como órgano diana de las células madre adultas

Son muchos los investigadores que han estudiado cual es el mecanismo de acción por el cual se logra regenerar la función ovárica. Como se ha mencionado previamente, las células madre adultas presentan una capacidad regenerativa a través de la liberación paracrina de factores solubles: citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, etc. Gracias a este mecanismo, podrían formar parte de la regeneración de los ovarios disfuncionales (82).

De hecho, los factores solubles descritos en las células madre ya habían sido previamente relacionados con la foliculogénesis en ovarios con función normal, como se ha descrito anteriormente en esta tesis. Entre los factores de crecimiento liberados de forma fisiológica por las células madre encontramos el IGF-1, el TGF- β (*del inglés, Transforming growth factor β*), el EGF (*del inglés, Epidermal Growth Factor*) y FGF1 – y FGF2 (*del inglés, "Fibroblast Growth Factor 1 and 2"*). El FGF- 2 ha sido relacionado con una respuesta positiva ante una terapia con células madre, gracias a su acción sobre las células de la granulosa (91).

Las células madre derivadas de la médula ósea, son células mononucleares con baja inmunogenicidad, lo cual las hace idóneas como terapia y trasplante. Tienen la capacidad de renovarse a si mismas, para mantener la población de células madre estables, pero además también tienen la capacidad de diferenciarse a otros tejidos (adipocitos, cartílago etc.). Estas células pueden migrar a otros tejidos dañados y diferenciarse, tras ser inducidas por la liberación de citoquinas de los tejidos dañados. Por otro lado, ellas mismas liberan citoquinas y factores de crecimiento, que favorecen la anti-apoptosis y antifibrois para restaurar el ovario, tales como el VEGF (*del inglés, vascular endothelium growth factor*), el IGF-1, y HGF (*del inglés hepatocyte growth factor*) (92).

Por otra parte, han sido publicados casos en la literatura en donde se describen una recuperación de la fertilidad o función endocrina del ovario, tras trasplante de médula ósea (TMO), en pacientes con POI iatrogénica tras quimioterapia a causa de enfermedades malignas. Estos casos describen, además, gestaciones espontáneas, en pacientes que presentaban una menopausia iatrogénica a causa de la quimioterapia mieloablativa que se administra en este tipo de enfermedades.

En 2001, el grupo de Hershlag (93) publicó cuatro casos clínicos distintos de menopausia precoz inducida tras quimioterapia o radioterapia. Las 4 pacientes recibieron como tratamiento coadyuvante de su enfermedad, además, trasplante autólogo de células madre. Se trataban de cuatro pacientes, dos de ellas con Linfoma Hodgkin (LF), y otras dos con carcinoma ductal infiltrante (CDI) de mama, que previo al tratamiento de su enfermedad conservaban menstruaciones regulares. Tras el tratamiento, todas ellas comenzaron con amenorrea y sintomatología climatérica, compatible con POI. Los autores publicaron gestaciones espontáneas en las 4 pacientes tras haber sido diagnosticadas de POI, probablemente consecuencia del trasplante autólogo de células madre.

El grupo de Veitia, expuso 5 años después (94), otro caso, en donde una mujer recuperaba la fertilidad y conseguía una gestación espontánea, tras haber sido diagnosticada de POI de causa iatrogénica. Esta paciente, con anemia de Fanconi, recibió quimioterapia mieloablativa y radioterapia, para posteriormente recibir un trasplante alogénico hematopoyético de HLA compatible (*del inglés, "Human leukocyte antigen"* o antígeno leucocitario humano). Años después, se evidenció un retorno de las menstruaciones, y una gestación espontánea con posterior nacimiento de un RNV prematuro (actualmente sano). Tras analizar el ADN (Ácido desoxirribonucleico) del bebe, el de la madre, y el de la donante, se constató la compatibilidad genética entre la madre y el bebe. En cambio se descartó la existencia de una relación genética entre la donante y el bebe. Con ello, es bastante improbable que las células madre produzcan una reposición directa de los ovocitos, si no a través de la regeneración del nicho ovárico.

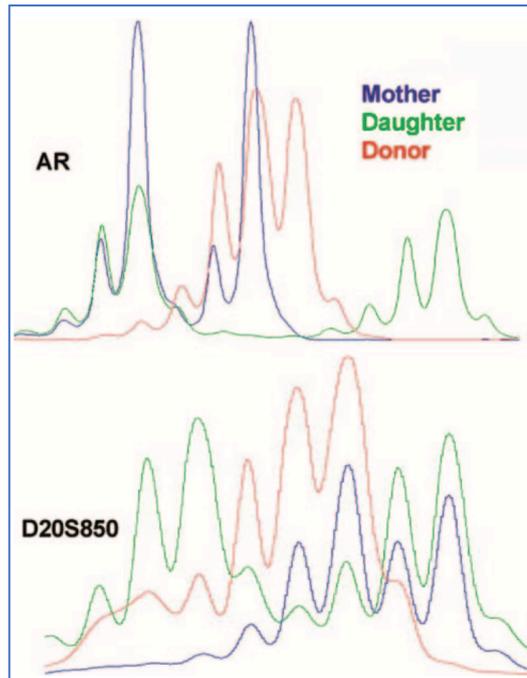


Figura 12: Análisis genético del ADN de la madre, de la hija y del donante. Se demostró una relación genética entre la madre y la hija, pero no entre la donante y la hija (94).

No obstante, en 2005, Johnson et al., arrojaron la teoría de que las células madre procedentes de médula ósea tenían la capacidad de repoblar la población ovocitaria directamente. Es decir, que los ovocitos eran generados de novo a partir de estas células madre (95). Sin embargo, esta teoría no fue respaldada por investigaciones posteriores (96).

Además, se han investigado las células madre en línea germinal procedentes del ovario, y su capacidad de generar directamente a partir de ellas ovocitos. El grupo de investigación de White, aislaron estas células, presentes en los ovarios de ratones adultos y en la corteza ovárica de mujeres en edad reproductiva. Posteriormente, cultivaron y propagaron su crecimiento, durante meses, tratando de obtener como resultado la producción de ovocitos inmaduros. A continuación, estas células fueron trasplantadas en los ovarios de ratones adultos, que tras meses de crecimiento indujeron el crecimiento folicular mediante estimulación con gonadotropinas, y tras la ovulación, generaron embriones a partir de los mismos. No obstante, de los 23 embriones obtenidos,

únicamente 8 expresaban el marcador GFP (green fluorescent protein), lo que significa que podrían derivar de la neoformación de ovocitos a partir de células madre (97). En ovario de humanos se siguió el mismo protocolo, xenotrasplantando posteriormente el tejido ovárico a ratones. Se obtuvieron de la misma manera, las células en línea germinal procedentes del ovario, y fueron xenotrasplantados posteriormente a ratones, obteniendo ovocitos (98).

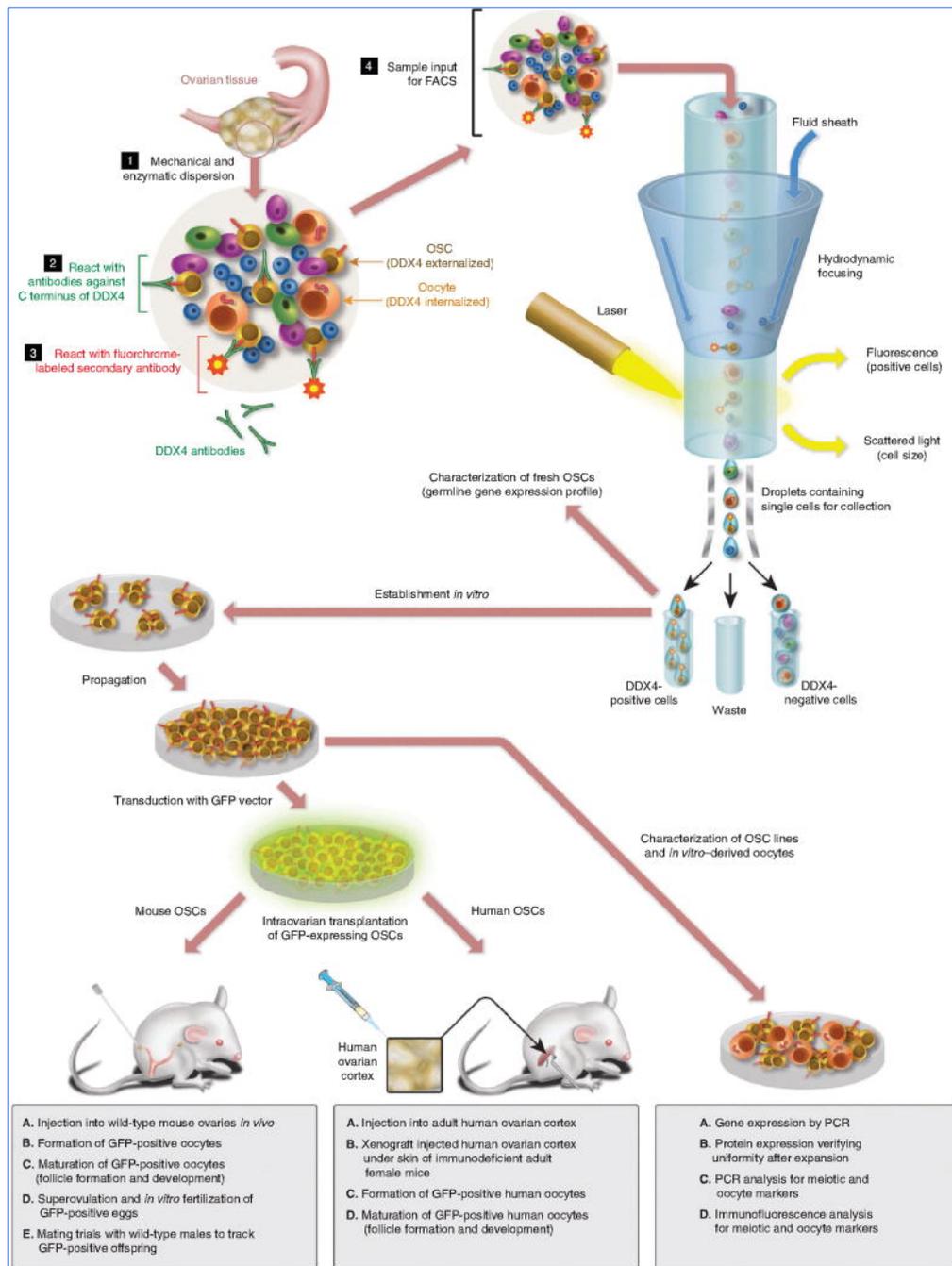


Figura 13: Protocolo de aislamiento de las células madre en línea germinal del ovario (98).

Sin embargo, estas células en línea germinal del ovario no han sido aisladas de nuevo, pese a numerosas investigaciones. Fue primero el grupo de Liu, quien no encontró esta clase de células madre en los ovarios de ratones adultos (99). Cinco años más tarde, se ha vuelto a publicar un artículo, en donde se afirma la no existencia de células madre en línea germinal del ovario (100).

Partiendo de esta serie de casos publicados, y de las distintas teorías sobre su mecanismo de acción, muchos investigadores han tratado de imitar este efecto de las células madre como terapia para pacientes con POR y POI. Previo al uso de terapia en células madre en humanos, se ha testado su utilidad y seguridad en animales, principalmente en roedores.

Se ha investigado el uso de células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical, en roedores (92). Estas células fueron trasplantadas en el ovario de los animales, que habían sido tratados con quimioterapia previamente, fundamentalmente con ciclofosfamida, un quimioterápico con elevada capacidad gonadotóxica, para inducir una menopausia. Tras ello, se evidenció un desarrollo folicular, una elevación hormonal, junto con la prevención de apoptosis de estos folículos (101). Algunos investigadores también describieron un retorno de la fertilidad, junto con generación de descendencia (102,103).

Por otra parte, se ha experimentado sobre el uso de células madre mesenquimales derivadas de líquido amniótico humano. Dichas células, se inyectaron directamente en el ovario, de animales que habían sido previamente tratados con quimioterapia para ser inducida la menopausia. Se demostró, al igual que con las células procedentes de cordón umbilical, una reducción de la apoptosis folicular, que por consiguiente conlleva una mejoría de la función ovárica. Liu et al. inyectaron en ratones con menopausia inducida, una subpoblación de células madre procedentes de líquido amniótico (CD44+/CD105+), y evidenciaron que dicha subpoblación tenía la capacidad no solo de permanecer en el ovario, si no de sobrevivir y proliferar en el ovario (in vitro e in vivo), a largo plazo (104). El grupo de Xiao, así mismo, con el trasplante de células madre procedentes de líquido amniótico, observaron un retorno de la fertilidad en ratones, con una estimulación de la foliculogénesis, y la generación de descendencia (105).

De la misma manera, han sido utilizadas las células epiteliales amnióticas y las células mesenquimales amnióticas obtenidas a partir de la membrana amniótica de origen humano (106). Estas células posteriormente han sido infundidas en roedores, con POR y POI inducida tras tratamiento con quimioterapia, permitiendo con ello una restauración de la foliculogénesis y de la producción hormonal (FSH y estradiol).

Como se ha mencionado previamente, las células madre procedentes de cordón umbilical o de líquido amniótico van a resultar una fuente autóloga muy poco accesible. Por este motivo, se han investigado nuevas fuentes, con mayor accesibilidad, y que ofrezcan la posibilidad de ser usadas posteriormente en humanos. Un ejemplo son las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (107), que han demostrado, aunque con menor eficacia que las células de líquido amniótico, recuperar la función ovárica en roedores con menopausia inducida por quimioterapia.

Por otro lado, también se han usado las células mesenquimales obtenidas desde la médula ósea, tras ser separadas del resto de población de células madre y cultivadas in vitro (108). Han demostrado una recuperación de la función ovárica en animales. Dicha fuente es accesible para poder ser empleada posteriormente en humanos.

Nuestro grupo de investigación, previo al ensayo clínico en humanos, realizó un ensayo piloto con animales, investigando la eficacia de las células madre derivadas de médula ósea como potencial tratamiento en pacientes con POI y POR. Para ello, se utilizó la población total células madre derivada de la médula ósea, obtenidas por aféresis tras tratamiento con G-CSF (del inglés "bone marrow derived stem cells", o BMDSC). Estas células fueron infundidas en dos grupos distintos de ratones inmunodeprimidos, a los que se les había reducido la reserva ovárica con distintas dosis de quimioterapia, usando mayor dosis para imitar pacientes con POI, y menor dosis para imitar pacientes con POR. A estos ratones previamente, se les había realizado un xenotransplante de tejido ovárico humano. Con todo ello, este estudio ha sido el primero en reportar efectos de células madre derivadas de médula ósea en tejido ovárico humano. En esta población de ratones, se reportó una recuperación de la

fertilidad a largo plazo, gracias a un aumento de la vascularización ovárica, de la proliferación de células a nivel del estroma ovárico y folicular, y a una reducción de la apoptosis folicular (1).

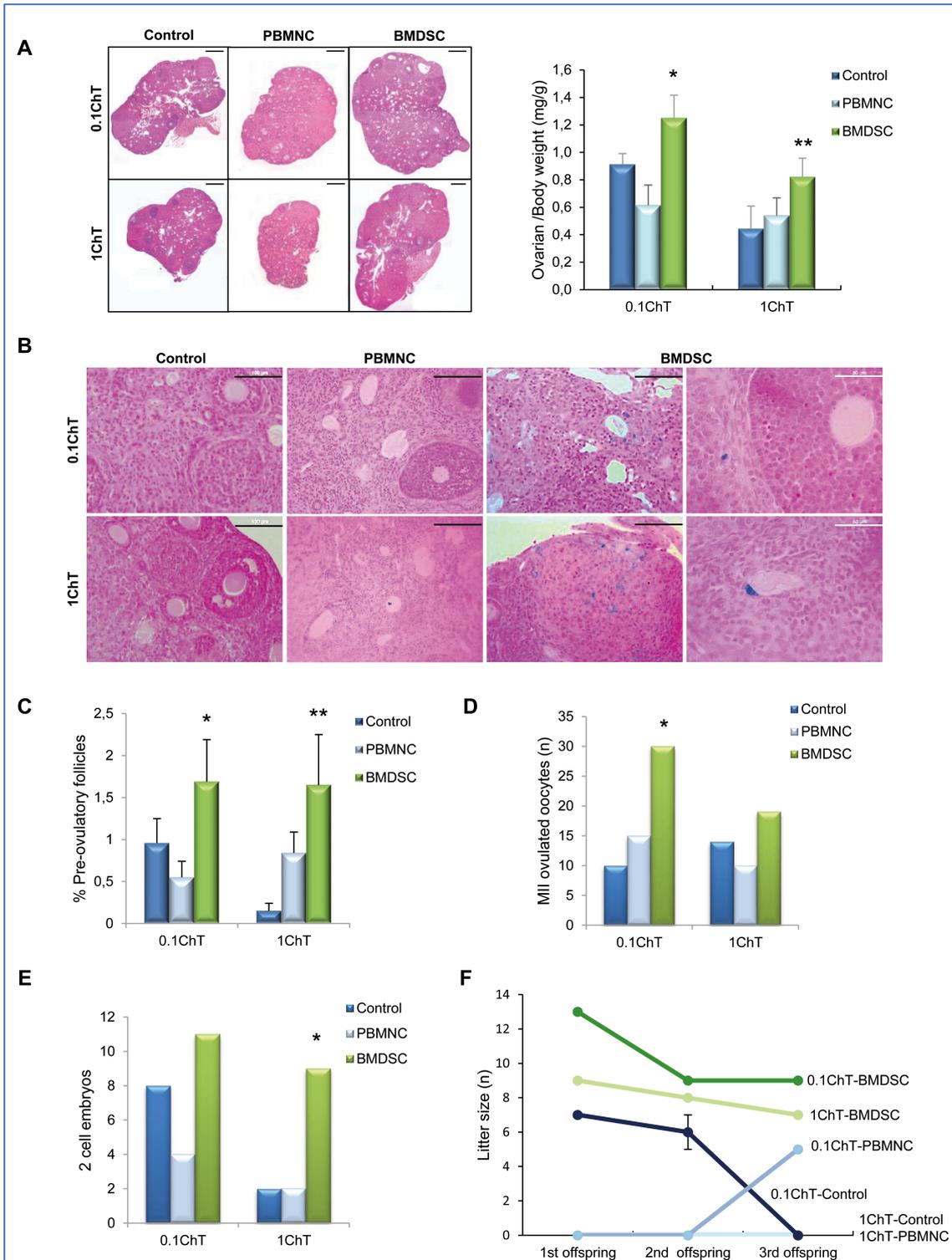


Figura 14: Resultados tras el tratamiento con BMDSC en ratones. (A) Secciones del ovario teñidas con hematoxilina-eosina. **Tras infusión con BMDSC se vio un aumento del peso del ovario, comparado con el grupo control. (B)**

Células BMDSC teñidas con azul de Prusia. (C) Aumento de los folículos preovulatorios en el grupo que recibió BMDSC (D) Aumento del número de ovocitos MII obtenidos en el grupo con BMDSC (E) Incremento en el número de embriones de 2 células, también en el grupo tras inyección con BMDSC (F) Y como consecuencia, mayor número de descendencia sana tras gestaciones naturales, tras la infusión con BMDSC (1).

En resumen, los estudios en animales han demostrado que la terapia con células madres podría ser una opción válida en el futuro para pacientes con POR y POI, y por ello, han motivado la realización de estudios en humanos, previo a su potencial uso terapéutico.

Hasta la fecha, los estudios publicados en humanos con uso de células madre derivadas de médula ósea, consistían en la obtención celular a través de la punción de la cresta iliaca, con posterior aislamiento de las células madre mesenquimales, y cultivo celular in vitro.

Gupta et al. describieron el nacimiento de un recién nacido vivo en una mujer postmenopáusica de 45 años tras esta técnica (109). Inyectaron las células derivadas de médula ósea en el ovario mediante laparoscopia, infundiéndolas en ambos ovarios. Con ello la paciente se expuso a dos técnicas invasivas, en un primer lugar a la punción de la cresta iliaca, y en un segundo lugar a la laparoscopia. Tras evidenciar un crecimiento folicular en ambos ovarios, iniciaron una EOC, y con ello se logró la gestación y posterior nacimiento de un RNV mujer. Fueron los primeros investigadores en reportar un recién nacido vivo tras terapia con células madre en una paciente de 45 años.

De la misma manera, el grupo de Edessy también inyectó células madre autólogas mesenquimales derivadas de médula ósea en ambos ovarios, así mismo optando por la vía laparoscópica (110). Esta técnica se llevó a cabo en 10 pacientes con POI, con una media de edad de entre 26 y 33 años, y siguieron controles exhaustivos durante un año. Los resultados, igualmente, fueron prometedores, con el retorno de la menstruación en dos pacientes, una gestación, y un recién nacido vivo sano (tasa gestacional del 10%).

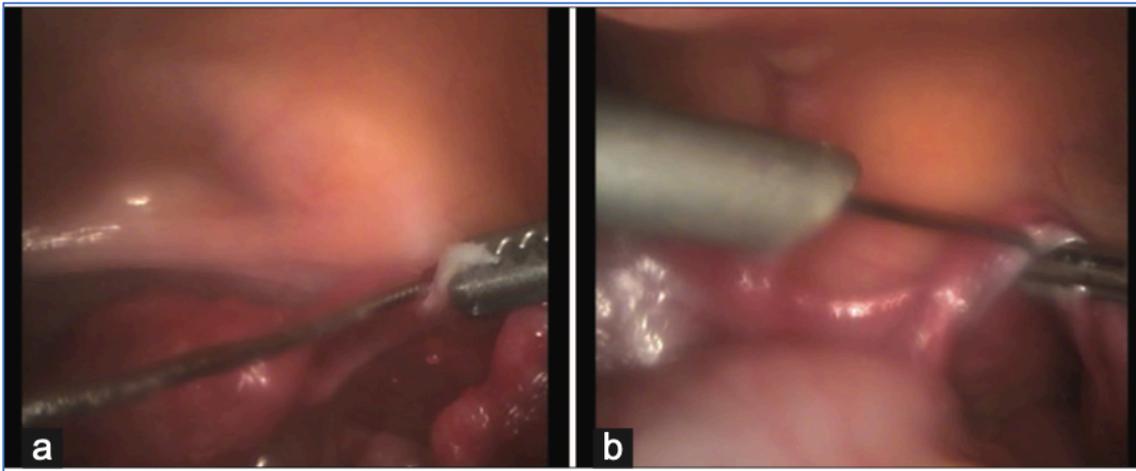


Figura 15: Inyección de células madre mesenquimales en ovario vía laparoscópica (110).

Siguiendo esta técnica, Gabr et al., emplearon células autólogas mesenquimales de médula ósea en 30 mujeres con POI idiopática, con un rango de edad muy amplio entre 18 y 40 años (111). De nuevo, para la obtención de las células, se realizó una aspiración medular desde la cresta iliaca. Para introducirlas en el ovario, aplicaron dos técnicas distintas: en dos grupos de pacientes. En un grupo de pacientes se inyectaron las células vía laparoscópica, mientras que en un segundo grupo se inyectaron mediante la cateterización de la arteria ovárica (para acceder a uno de los dos ovarios). Tras esta técnica se obtuvo una mejoría hormonal hasta en un 86.7% de las pacientes, con un efecto duradero, de hasta dos años. A pesar de que a 3 pacientes se les realizaron ciclos de FIV, se consiguió una gestación, obtenida de forma espontánea.

Al Hendy et al., tras obtener resultados prometedores en sus estudios en animales, están llevando a cabo estudios similares a los anteriores descritos, con células mesenquimales de médula ósea en 33 pacientes con POI y POR. Los resultados no han sido publicados por el momento, pues el estudio continúa en marcha actualmente (112).



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La médula ósea contiene células madre progenitoras que, tras alcanzar el nicho apropiado, pueden favorecer la foliculogénesis estimulando estructuras ováricas durmientes o inmaduras ya existentes. De esta forma, podría aumentarse la cohorte folicular final reclutada en las mujeres con POR y POI.

2.2 Objetivos

2.2.1. Objetivo principal

El propósito de la presente investigación es favorecer el crecimiento folicular, en mujeres estériles con POR y POI, utilizando la capacidad de las células madre derivadas de la médula ósea (BMDSC) de estimular la regeneración del nicho ovárico.

2.2.2. Objetivos secundarios en POR Y POI

- Estudiar la dinámica de la reserva ovárica tras el trasplante de células madre derivadas de médula ósea.
- Investigar el estado funcional de estos folículos y su respuesta a las gonadotropinas exógenas.
- Análisis de la calidad de los embriones resultantes, mediante criterios morfológicos clásicos, tras la estimulación ovárica controlada.
- Valoración de la tasa de gestación.
- Valorar la seguridad del método utilizado.

2.2.3 Objetivos secundarios únicamente estudiados en POI

- Analizar tasa recuperación ciclo menstrual tras las intervenciones realizadas en ambos grupos. Valorar la transitoriedad del efecto.
- Valorar la mejoría en la sintomatología vasomotora.
- Evolución de los niveles de FSH y E2 tras la intervención.
- Valorar la seguridad del método utilizado con o sin infusión directa de las células en ovario.
- Evaluar efecto adicional de su re-infusión en el ovario.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ASCOT POR (ASCOT-1)

3.1.1. Diseño del estudio

El primer ensayo clínico tuvo lugar en pacientes con POR. Se trataba de un estudio piloto prospectivo observacional descriptivo, diseñado con el objetivo de evaluar la eficacia de la infusión intraovárica de células de la médula ósea (BMDSC) en la foliculogénesis en pacientes con POR. Este estudio fue aprobado por El Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (CEIB La Fe 2014/00147) y registrado en Clinical Trials: NTC02240342. Al tratarse de un proyecto piloto de investigación sobre el que no había experiencia ni datos previos para realizar un cálculo del tamaño muestral en base al tamaño del efecto, se estableció que el número de sujetos previstos a incluir en el estudio era de 20.

La población de estudio estaba constituida por 20 pacientes de la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario La Fe, afectas de esterilidad subsidiaria de tratamiento mediante FIV o ICSI, y que cumplían los criterios de POR según los criterios de Bolonia de la ESHRE (33).

Los criterios de inclusión, para este primer estudio con pacientes POR, fueron los siguientes:

- Pacientes \leq de 40 años.
- FSH sérica $<$ 20UI/l.
- Antecedente de pobre respuesta ovárica en respuesta a la EOC en un ciclo previo realizado con estimulación convencional y obtención de 3 o menos ovocitos (uno de los 3 criterio de Bolonia para POR).
- AFC $>$ 2 folículos y con presencia de al menos 1 folículo en el ovario que se iba a infundir.
- AMH con un valor entre 0.5 y 3 pmol/L.
- La presencia de menstruaciones regulares (ciclos entre 21 y 35 días).

- Cumplir criterios estándar para la donación autóloga de progenitores hematopoyéticos en el hospital Universitario y Politécnico La Fe.

Por otro lado, los siguientes requisitos, formaban parte de los criterios de exclusión:

- Endometriosis ovárica.
- Anovulación.
- Cualquier cirugía sobre el ovario (considerada como un factor de riesgo de pobre respuesta).
- Factores genéticos asociados a pobre respuesta (por ejemplo el síndrome de Turner, premutaciones FMR1...).
- Condiciones adquiridas asociadas a pobre respuesta (ej. Tratamiento con quimioterapia, radioterapia...).
- Índice de masa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m².
- Padecer alergia al yodo o al contraste yodado, y tener insuficiencia renal.

Todas las participantes entendieron, aceptaron, y firmaron, el consentimiento informado por escrito (*ver Anexo II*).

Este primer estudio consistía en la movilización de células madre derivadas de médula ósea (BMDSC), al torrente sanguíneo, tras la administración de factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), y posterior recolección celular mediante aféresis en sangre periférica. Tras ello, las células eran infundidas en una de las arterias ováricas, mediante cateterismo intraarterial, sirviendo de esta manera, el ovario contralateral como control.

El estudio, por tanto, recibió el nombre de ASCOT (*del inglés, "autologous stem cell ovarian transplantation"*).

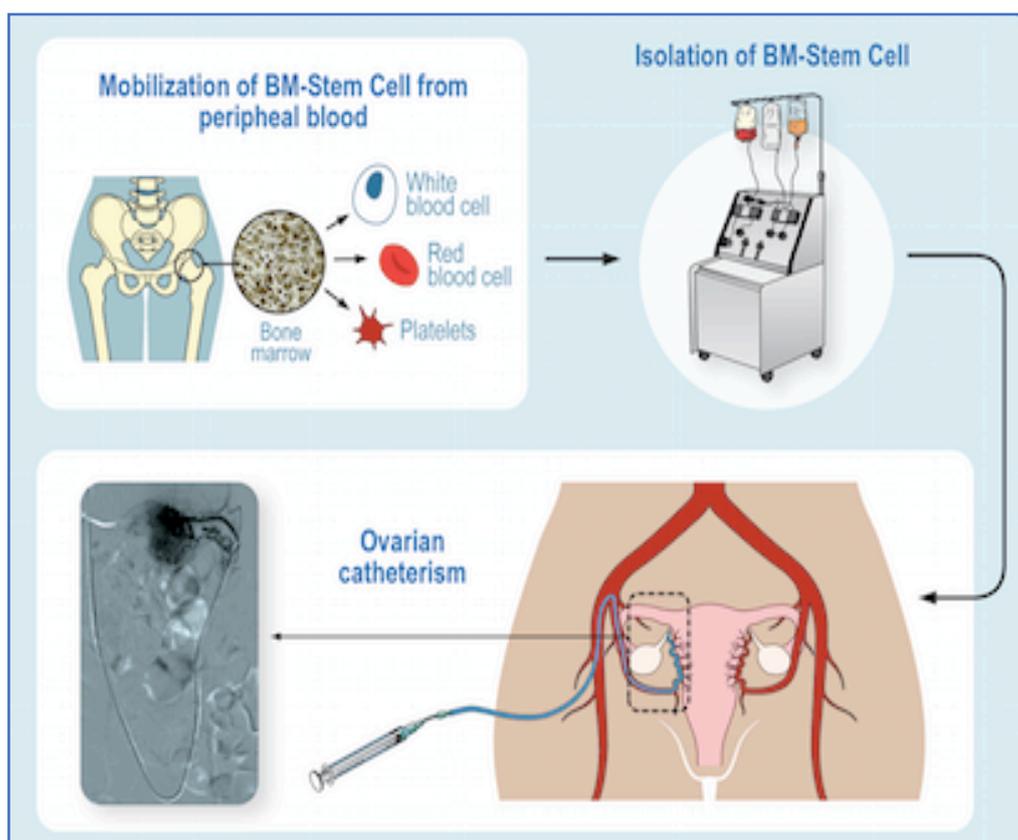


Figura 16: Diagrama de la técnica ASCOT.

El objetivo principal del estudio era la evaluar la mejoría clínica de la reserva ovárica, objetivándose por medio de un aumento del AFC y valores séricos de AMH. Estos parámetros se monitorizaron durante 6 meses tras la infusión celular.

Otros parámetros que se midieron también, como objetivos secundarios, era el número de folículos puncionados, ovocitos en metafase II (MII) obtenidos tras la EOC, el número de embriones obtenidos y la proporción de embriones euploides, el número de tratamientos de FIV realizados, la tasa de cancelación en los ciclos de FIV, y la tasa gestacional acumulada.

Se podía obtener la gestación en el estudio, o bien por transferencia de embriones en fresco, o tras transferencia de embriones congelados. Por otro lado, también se consideró la opción de gestaciones espontáneas.

Además, con el objetivo de entender e identificar los posibles cambios inducidos por ASCOT a diferentes niveles, se realizaron una serie de estudios experimentales adicionales. Se analizó por un lado la composición de la aféresis en cuanto a su concentración en diferentes tipos de células madre, así como de factores específicos secretados por ellas en aféresis, tratando de correlacionar los hallazgos de la muestra con los mecanismos involucrados en la reserva ovárica, y como ésta se veía alterada tras la realización de la técnica ASCOT. Para ello, se analizaron distintos factores de crecimiento liberados por las células madre derivadas de médula ósea.

Finalmente, con el objetivo de evaluar los cambios globales del perfil de proteínas del plasma inducido por ASCOT, se recolectaron muestras de plasma de las pacientes en el reclutamiento, en aféresis y a los 3 meses de ASCOT para evaluar los cambios en todas las proteínas presentes en plasma.

3.1.2. Movilización células madre desde médula ósea y aféresis

Para la obtención de los progenitores hematopoyéticos en sangre periférica (CPSP), se siguieron los siguientes pasos detallados a continuación:

3.1.2.1. Movilización células madre desde médula ósea

En un primer lugar y tras haber firmado el consentimiento informado, se evaluaba a la paciente de acuerdo con las regulaciones del Ministerio de Sanidad Español y a las recomendaciones de JACIE (Joint Accreditation Committee ISCT-Europe & EBMT) para la recolección y trasplante de progenitores hematopoyéticos. A todas las pacientes se les extraía una analítica de sangre para determinación serológica de los siguiente microorganismos: citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), herpes simple (VHS), varicela -zoster (VVZ), hepatitis A (VHA), hepatitis B (VHB), hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus linfotrópico humano de células T tipo 1 y 2 (HTLV-1, HTLV-2), treponema pallidum y toxoplasmosis. Junto con

la serología, se realizaba un estudio molecular del VHC. Además, se llevaba a cabo, un recuento de células sanguíneas en sangre periférica en un hemograma, la hemoglobina y hematocrito, un análisis bioquímico básico, coagulación, test de embarazo, grupo sanguíneo y Rh.

Una vez el servicio de hematología consideraba que no existían contraindicaciones por parte de la paciente para llevar a cabo el procedimiento, se iniciaba el tratamiento para la movilización de CPSP. Dicho tratamiento consistía en la inyección vía subcutánea de 10µg/kg de G-CSF durante 5 días consecutivos, dividida en dos dosis diarias. Este procedimiento es idéntico al utilizado de manera rutinaria para recolección de CPSP para posterior autotrasplante.

3.1.2.2. Recolección celular y aféresis.

En el quinto día de movilización celular, se realizaba la recolección de CPSP mediante aféresis. Se consideraba que las pacientes habían completado con éxito la movilización cuando alcanzaban un valor de 4×10^6 CD34 +células por kg, el valor establecido para considerar que la movilización había sido efectiva. Para ello, se utilizaron los procedimientos estandarizados en la Unidad de Aféresis y Terapia Celular, incluyendo el proceso de aféresis por flujo continuo con el separador celular OPTIA® (*Caridian, Denver, USA*). La recolección de CPSP se llevaba a cabo siempre bajo la supervisión de expertos en recolección y manipulación de células madre. Para acceder a la vía sanguínea periférica, se realizaba un doble acceso venoso periférico, únicamente realizándose una canalización venosa central en aquellos casos en los que la vía periférica no era factible.

Inmediatamente tras la recolección celular, se obtenían muestras del producto recolectado para posterior análisis y estudio de las distintas poblaciones celulares por citometría de flujo, en plataformas estándar. Se analizó la proporción de células CD34+ y CD133+ recolectadas en el total de la muestra.

Una vez estudiada la muestra, el producto se enviaba al servicio de Radiología Intervencionista para su infusión.

Todos los procedimientos se hicieron bajo la cobertura de un programa específico de calidad en trasplante hematopoyético y terapia celular.

3.1.3. Análisis de las poblaciones celulares de la aféresis

El primer paso, fue la caracterización de las poblaciones celulares dentro de la aféresis mediante citometría de flujo.

Con este objetivo, se preparó la muestra a analizar de la siguiente manera. Se determinó el número absoluto de leucocitos en un Coulter DxH 800 (*Beckman Coulter, Brea, CA*). Para no superar el número de 50×10^9 células/L, la alícuota de la aféresis se diluyó con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS *Gibco BRL, Waltham, MA, USA*). Posteriormente, se obtuvo 100 μ L de mencionada dilución y se incubó en un tubo TruCount™ (*BD, Franklin Lakes, NJ, USA*), combinándolo con los anticuerpos anti-CD133-PE (*CD133/2-PE, Miltenyi Biotec, GmbH, Alemania*), anti-CD34-APC (*BD, Franklin Lakes, NJ, USA*) y anti-CD45-FITC (*5B1, Miltenyi Biotec, GmbH, Alemania*), también con 7-AAD (7-aminoactinomicina D), durante 15 minutos y en la oscuridad, a 4°C. A continuación, se incubó la muestra con solución hemolizante Pharm Lyse™ (*BD, Franklin Lakes, NJ, USA*) durante 10 minutos, también en la oscuridad y a 4°C, con el objetivo de conseguir la destrucción de los hematíes.

Finalmente, la muestra se analizó empleado el citómetro de flujo "MD FACSCalibur" (*BD, Franklin Lakes, NJ, USA*) hasta registrar un mínimo de 200.000 eventos. Con ayuda del software Infinicyt™ (*Cytognos, Salamanca, España*), se determinó el porcentaje de células CD34+ y CD133+ viables dentro de la celularidad total. Además, dentro de la población de células CD133+ viables, se evaluó la expresión del marcador CD34 (y las distintas subpoblaciones celulares CD133+CD34+ y CD133+CD34-) y el marcador de

leucocitos CD45. Dependiendo de la expresión de CD45, se dividió la población de células CD133+ viables en tres subpoblaciones distintas:

- CD133+CD45++: expresión elevada de CD45, muy diferenciadas.
- CD133+CD45+: baja expresión de CD45 y poco diferenciadas.
- CD133+CD45- : células indiferenciadas sin expresión de CD45.

Las células no viables, que expresaban 7-AAD, se excluyeron del análisis. Para cuantificar las células CD133+ y CD34+ viables en números absolutos, se utilizaron los tubos TruCount™ y, se empleó la siguiente fórmula:

$$N^{\circ}\text{cél}/\mu\text{L} = n^{\circ}\text{ eventos de interés} \times \frac{n^{\circ}\text{ perlas en el tubo TruCont}}{n^{\circ}\text{ perlas leídas por el citómetro}} \times \frac{\text{factor de dilución}}{100}$$

3.1.4. Cateterización intraarterial

Las pacientes del estudio, previamente admitidas por parte del servicio de Radiología intervencionista, y tras comprobar que no cumplían criterios de exclusión, como la alergia al contraste yodado, fueron derivadas a dicho servicio para la infusión de las células obtenidas tras la aféresis. El tiempo entre la colección de las células por aféresis, hasta la infusión celular, fue menor de 24 horas en todos los casos.

La cateterización intraarterial, se llevó a cabo en la sala de angiografía digital del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Las células madre se liberaban en una de las dos arterias ováricas de cada paciente, ya que el ovario contralateral actuaba como control del estudio. Para ello, en un primer lugar, el médico radiólogo intervencionista, empleaba la técnica de Seldinger para acceder a la arteria femoral, con un introductor de 4F, y a través de este procedía a cateterizar una de las arterias ováricas con un catéter Cobra 2 o Simons y una guía de Terumo 0,035". A través de este catéter, se colocaba un microcatéter de 2,5 F con una guía de 0.014" hasta el punto final seleccionado, donde se liberaban las CPSP en una suspensión de suero fisiológico.

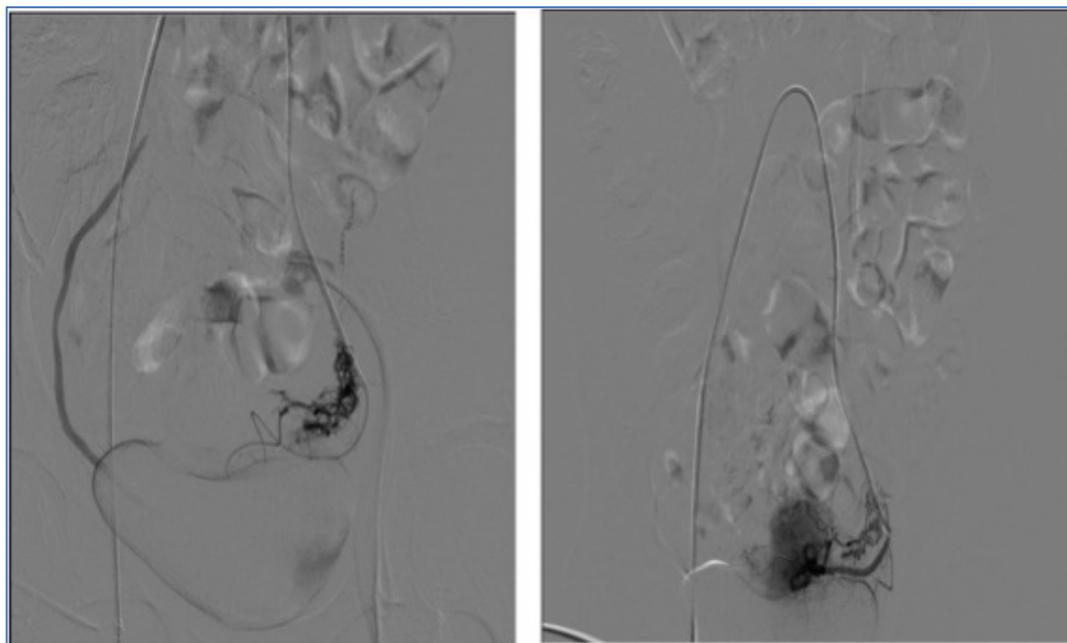


Figura 17: Cateterización intraarterial de la arteria ovárica.

El volumen total de células infundidas se determinó de forma que se asegurara la infusión de un total de 50×10^6 células CD133+ sin llevar a cabo ningún tipo de manipulación ni selección celular.

3.1.5. Seguimiento de las pacientes

Los marcadores de respuesta ovárica a la técnica ASCOT eran el incremento en AFC, medido por ecografía transvaginal, y los niveles séricos de hormona AMH. Ambos marcadores fueron obtenidos previo al inicio del estudio, en todas las pacientes, en condiciones basales. Tras la técnica ASCOT, las pacientes acudieron al servicio de Reproducción del Hospital La Fe para seguimiento y control, inicialmente durante las dos primeras semanas cada 2 días, posteriormente una vez a la semana durante 4 semanas, y finalmente un control mensual durante los 5 meses restantes. En cada visita, se realizaba una analítica sanguínea para determinar el valor de la AMH sérica y se llevaba a cabo una ecografía transvaginal para valorar el AFC.

La ecografía transvaginal era llevada a cabo por dos operadoras del estudio, mediante un ecógrafo de la compañía General Electric iVolution, equipado con una sonda vaginal 3D (6.5 -9 MHz). Se consideraban como folículos antrales las áreas anecoicas incluidas en el parénquima ovárico, con un tamaño entre 2 y 10 mm. La AMH se determinaba en el laboratorio, mediante el sistema Cobas Elecsys 2010 AMH ELISA assay (Roche Diagnostics). Este sistema presentaba un límite de detección de 0,7 pmol/L con una variación inter-ensayo del 3.8%.

Se consideró repuesta positiva a ASCOT cuando se evidenciaba un aumento en el AFC de 3 o más folículos antrales, y/ o un incremento de 2 desviaciones estándar (DE) en el valor de la hormona AMH, en comparación con los parámetros basales.

3.1.6. EOC, ICSI, protocolos de screening genético embrionario (PGT-A) y transferencia embrionaria.

Durante el seguimiento de las pacientes, se inició una EOC en aquellas que se evidenciaba una respuesta positiva a ASCOT en el AFC. No obstante, este criterio no pudo tenerse en cuenta en todas las ocasiones debido a inconvenientes en los horarios de las pacientes o médicos del estudio.

3.1.6.1. Estimulación ovárica e ICSI

La estimulación ovárica controlada, se realizó con el mismo protocolo utilizado en los ciclos realizados previo a ASCOT. En la mayoría de pacientes, el protocolo utilizado fueron 300 UI de FSH recombinante (Gonal -F, Merk), junto con 150 UI de hMG (Menopur, Ferring), administrados diariamente y de forma conjunta. Cuando el folículo de mayor tamaño alcanzaba 13 – 14 mm de diámetro, y / o el estradiol sérico alcanzaba valores de 400 pg/mL se introducía el antagonista de la GnRH (Cetrotide, Merk). La inducción de la ovulación se realizaba con la administración de hCG (Ovitrelle, 250 g, Merk), cuando el folículo

de mayor tamaño era igual o mayor a 18 mm. La punción folicular se realizaba 36 horas tras la administración de la hCG, bajo sedación, y en el quirófano de FIV de la Unidad de Reproducción Asistida.

Los ovocitos eran denudados 2 horas tras su recolección, y posteriormente se llevaba a cabo la fecundación mediante la inyección intracitoplasmática espermática (ICSI), con espermatozoides obtenidos en fresco.

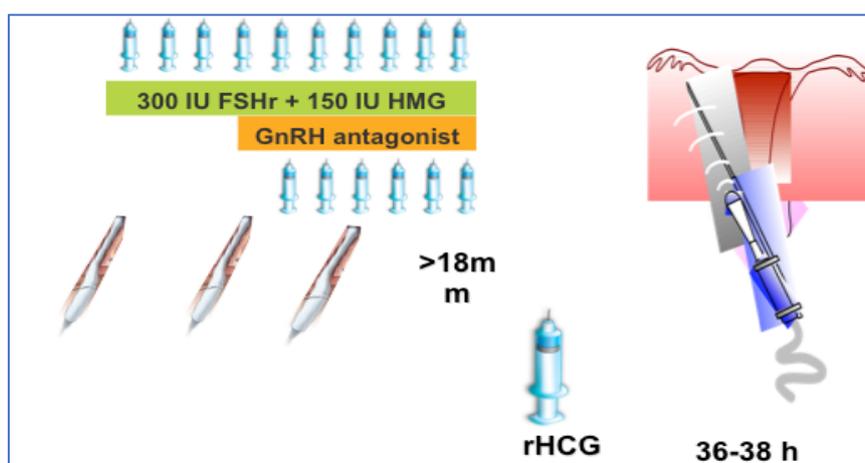


Figura 18: EOC en pacientes POR tras ASCOT

3.1.6.2. PGT-A

Los embriones obtenidos fueron analizados mediante PGT- A. La biopsia de los embriones se realizó en estadio de 8 células (o tercer día de desarrollo embrionario) obteniéndose 1 célula. Para ello, se realizaba una solución de continuidad en la zona pelúcida mediante láser con el fin de obtener mediante aspiración 1 o 2 blastómeras. El material genético fue amplificado mediante PCR lo cual permitió el análisis de todos sus cromosomas mediante técnicas de microarrays de hibridación genómica comparada (CGH).

Los embriones euploides se vitrificaron, en día 3 desarrollo embrionario, empleando el sistema de vitrificación Cryotip.

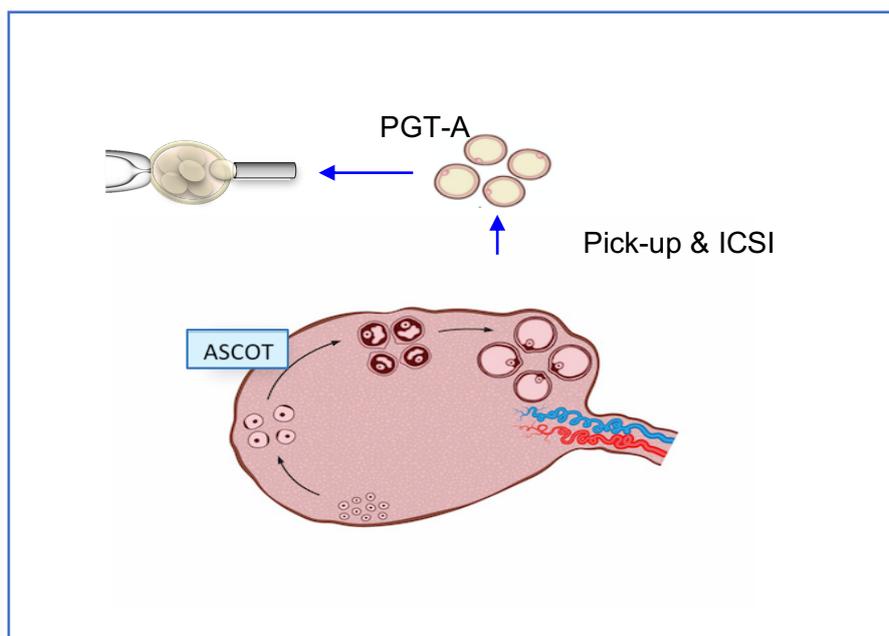


Figura 19: PGT-A en los embriones obtenidos por FIV tras ASCOT

3.1.6.3. Transferencia embrionaria.

La transferencia embrionaria, por tanto, se realizó con embriones vitrificados y en día +3 de desarrollo embrionario, debido al retraso temporal que provoca el análisis genético PGT-A. Para ello, se realizó un ciclo de transferencia embrionaria en ciclo sustituido, con administración de estrógenos vía transdérmica (Evopad, 150 mg, Janssen-Cilag ®) durante aproximadamente 12 días (imitando la fase folicular) y posterior fase lútea añadiendo progesterona (600 mg/día, progeffik, Effik ®, o utrogestan SEID ®).

3.1.7. Cuantificación de factores solubles secretados por BMSDC en aféresis.

Así mismo, se cuantificó la concentración de factores solubles en aféresis, factores secretados por las células madre circulantes en sangre periférica tras la movilización, que podrían tener un papel en los efectos regenerativos de estas

células en el ovario. Los factores solubles cuantificados fueron el FGF-2, el PDGF-BB (*del inglés, platelet-derived growth factor beta*, o factor de crecimiento derivado de plaquetas BB), el THSP-1 (*del inglés, thrombospondin- 1*), el IGF-1, el KL (*del inglés, kit- ligand*), IL-11 (*del inglés interleukin-11 o interleuquina 11*), BMP-6 (*del inglés, Bone Morphogenetic Protein 6*), y el TNF α (*del inglés, tumor necrosis factor*, o factor de necrosis tumoral alfa).

En primer lugar, para que la cuantificación de factores solubles fuese posible, se obtuvo plasma sanguíneo y se almacenó a -80°C hasta su uso. Se recolectó una alícuota de plasma durante la aféresis para este motivo, en un tubo BD Vacutainer® con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*BD Diagnósticos, España*) y se aisló mediante una centrifugación de 10 minutos a 1600g 4°C. Tras la centrifugación se obtuvieron muestras plasmáticas que permitían la cuantificación de factores mediante ELISA o ELISA multiplex.

El título de FGF-2 y PDGF-BB se determinó utilizando “ProcartaPlex Human FGF-2 y PDGF-BB Simplex kits” (Affymetrix eBioscience, LabClinics S.A.), siguiendo el protocolo del fabricante. El límite inferior para FGF era de 4.90 pg/mL, mientras que el límite para PDGF-BB era de 7.32 pg/mL.

Por otro lado, la titulación de KL, THSP-1, IGF-1, IL-11 y BMP-6 se llevó a cabo mediante los kits *Human SCF Immunoassay Quantikine ELISA*, *Human Thrombospondin-1 Quantikine ELISA*, *IGF-I Quantikine ELISA*, *Human IL-11 Quantikine ELISA* (R&D Systems Europe, Abingdon, UK) y *BMP-6 Human ELISA* (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), respectivamente, siguiendo el protocolo del fabricante.

La determinación de los factores “KL, IGF-1, IL-11 y BMP-6” se llevó a cabo sin dilución de las muestras. En cambio, para analizar el THSP-1 si que se realizó una dilución de las muestras (1:2-1:50). Para el factor IGF-1, las muestras se trataron previamente con solución de disociación ácida, que permitía la liberación de este factor desde las proteínas (ya que originalmente se encuentran unidas al mismo).

Para determinar la concentración de los factores (KL, THSP-1, IGF-1, IL-11 y BMP-6), se realizó la siguiente técnica: Se añadieron 100 μ L de cada muestra de plasma a una microplaca de 96 pocillos, cada uno recubierto con anticuerpos de los distintos factores solubles (anti-KL humano, anti-THSP-1 humano, anti-IGF-1 humano, anti-IL-11 humano o anti-BMP-6 humano). La placa se incubó a temperatura ambiente durante dos horas, y se realizaron 3 lavados posteriores. Posteriormente, se añadieron a los pocillos un anticuerpo secundario policlonal específico para el factor soluble de interés conjugado con peroxidasa, y se dejó incubando de nuevo 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron de nuevo tras las dos horas, y se añadió una solución que contenía peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina, para ser incubados de nuevo durante 30 minutos en la oscuridad. incubando la placa durante 30 min en oscuridad. La reacción colorimétrica se paró mediante una solución 2N de ácido sulfúrico. Para finalizar, se midió la absorbancia de los pocillos a 450 nm, empleando el espectrofotómetro SPECTRAmax PLUS 384 (*Molecular Devices, San José, CA, USA*). Entonces, la concentración de los factores solubles se calculó tras realizar una extrapolación del valor de la absorbancia de las muestras en la curva patrón, generada a partir de los estándares. Cada factor soluble tenía su propio factor de detección (LOD), con variación intra- e inter-ensayo de los kits (*Tabla 1*).

Por otro lado, los factores solubles FGF-2, PDGF-BB y TNF- α se determinaron en un único ensayo, mediante Procartaplex (*Affymetrix ebioscience*), *ProcartaPlex Human FGF-2, PDGF-BB y TNF alpha Simplex kits* (*Affymetrix ebioscience, LabClinics S.A., Barcelona, Spain*). Para determinar la concentración de dichos factores, se siguió la siguiente técnica: se obtuvieron las muestras de plasma. Primero, los pocillos de una microplaca se recubrieron con tres tipos de partículas magnéticas: partículas magnéticas conjugadas a anti-FGF-2, partículas magnéticas conjugadas a anti-PDGF-BB y partículas magnéticas conjugadas a anti-TNF- α . Posteriormente, a cada muestra se añadió 25 μ L de cada uno de los, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación (a 500 revoluciones por minuto). Se lavó la muestra varias veces, mediante un *Hand-Held Magnetic Plate Washer* (*Affymetrix ebioscience, LabClinics S.A., Barcelona, Spain*) que favorecía la retención de las partículas

magnéticas en la placa. Finalmente se añadió una mezcla de anticuerpos secundarios biotinilados (anti-FGF-2, anti-PDGF-BB y anti-TNF- α) y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo varias veces para eliminar los excesos de anticuerpos, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, con moléculas de estreptavidina marcadas con el fluoróforo PE (Phycoerythrin). Para acabar, se añadió un tampón de lectura y se procedió a leer la placa con un equipo Luminex 100/200 (*Luminex Corporation, Texas, USA*). Los resultados fueron analizados empleando el software *ProcartaPlex Analyst 1.0 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)*.

Así mismo, cada factor soluble, tuvo su propio LOD. (*Tabla 1*)

| Factor soluble | LOD | Variación intra-ensayo | Variación inter-ensayo |
|--------------------------------|-------------|------------------------|------------------------|
| THSP-1 | 0,355 ng/mL | 6,4 % | 5,9 % |
| IGF-1 | 0,026 ng/mL | 4,0 % | 8,0 % |
| BMP-6 | 150 pg/mL | <10% | <12% |
| KL | 9,000 ng/mL | 3,3 % | 7,1 % |
| IL-11 | 8,000 pg/mL | 4,7 % | 6,3 % |
| FGF-2 | 4,90 pg/mL | - | - |
| PDGF-BB | 732 pg/mL | - | - |
| TNF-α | 8,54 pg/mL | - | - |

Tabla 1: LOD y variaciones intra- e inter- ensayo.

3.1.8. Análisis perfil proteómico en muestras de plasma de pacientes mediante SWATH LC/MS.

Como se ha mencionado previamente, se recolectaron muestras del plasma de las pacientes en tres momentos distintos del ensayo, con la finalidad de evaluar los cambios producidos por ASCOT en el perfil de proteínas del plasma. Para ello, se realizó el siguiente procedimiento:



3.1.8.1. Recolección de muestras y asilamiento del plasma

Para el estudio de la proteómica, se obtuvieron muestras plasmáticas de todas las pacientes, previo al tratamiento con ASCOT (PRE), durante la aféresis de la técnica ASCOT (AFÉRESIS), y posteriormente 3 meses tras haber realizado ASCOT (POST). El plasma se obtuvo en tubos BD Vacutainer® EDTAK2 (BD Diagnostics, NJ, USA). Así mismo, una alícuota de la aféresis de cada paciente, se recolectó también en tubos de EDTA. Todas las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos y a 4°C, para lograr aislar el plasma, y posteriormente aisladas a -80°C.

3.1.8.2. Análisis proteómico

En todas las muestras plasmáticas obtenidas (PRE, AFÉRESIS, POST), de cada paciente, se analizaron y cuantificaron las proteínas mediante la técnica SWATH. Con el fin de preparar las muestras para el análisis proteómico, 150 µL de cada muestra se centrifugó a 15000xg durante 15 minutos, a 5°C, con la intención de separar las lipoproteínas de sangre periférica (también conocido como delipidación). Estos análisis fueron llevados a cabo en el servicio de proteómica de la Universidad de Valencia.

A) Preparación del pool de proteínas, extracción y digestión de las muestras

Con el objetivo de generar una librería con todas las posibles proteínas presentes en las muestras, se generó una nueva muestra formada por un pool de todas ellas. Para ello se generó una nueva muestra (pool) combinando los 15µL de cada muestra de paciente. De esta nueva muestra, se emplearon 50µL, y se precipitaron con EtOH (etanol) helado a una concentración del 40%, durante 2 horas y a 5°C. La muestra fue centrifugada durante 1 hora a 15000g, y el sobrenadante (que contenía albúmina de suero humano), fue desechado. El

pellet se dejó secar al aire, y las proteínas precipitadas se validaron empleando diluciones 1:1 con 150 nM de NaCl (cloruro de sodio) en 12% gel SDS-PAGE (*del inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* o electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) teñido con Coomassie Coloidal (*Figura 20*).

Con el propósito de reducir la complejidad de las proteínas, para el análisis LC-MS/MS (*del inglés Liquid chromatography–mass spectrometry*, o combinación de la cromatografía líquida y la espectrometría de masas), el gel se fraccionó en porciones y se incubó durante la noche a 37°C con 500ng de tripsina (*Promega*), para conseguir la digestión enzimática (113). La digestión se interrumpió con 20% de ácido trifluoroacético, y el sobrenadante se cogió antes de deshidratar las porciones de gel con acetonitrilo. Las nuevas soluciones proteicas, se combinaron con su sobrenadante correspondiente, se secaron al vacío, y se resuspendieron en acetonitrilo al 2% y trifluoroacético al 0.1%. El volumen final se ajustó (en 6 -10 µL) dependiendo de la intensidad de la tinción.

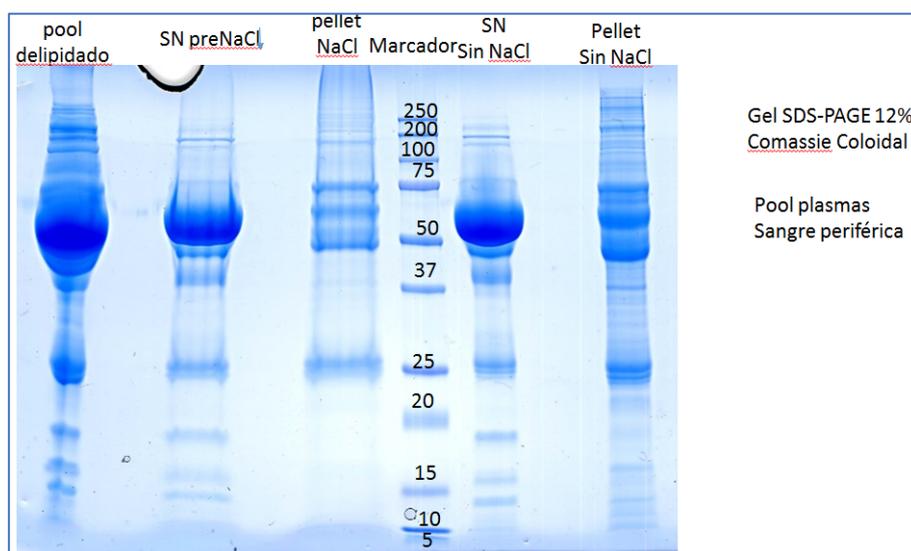


Figura 20: Gel coomasie coloidal. Para el paso de precipitación se probaron diferentes condiciones de precipitación del pellet con y sin NaCl.

B) LC-MS/MS y construcción de la librería de proteínas

El protocolo de LC-MS/MS se adaptó del protocolo previamente descrito por Sáenz-de-Juano et al. (114). Las mezclas proteicas digeridas (5 μ L) se cargaron en NanoLC Columns (3 μ C18-CL, 75 μ m \times 15cm; Eksigent Technologies), y fueron desaladas con 0.1% de ácido trifluoroacético a 3 μ l/minutos durante 5 minutos. Las “Analytical columns” (LC Column, 3 μ C18-CL, 75 μ m \times 12cm, Nikkyo) fueron equilibradas en una solución de acetonitrilo (5% de acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico), previo a eluir los péptidos con un gradiente lineal de 5-35% de solución de acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico durante 30 minutos, a una tasa de flujo de 300 nL/min. Los péptidos se analizaron en una MS nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX) y se creó una biblioteca combinando todos los datos.

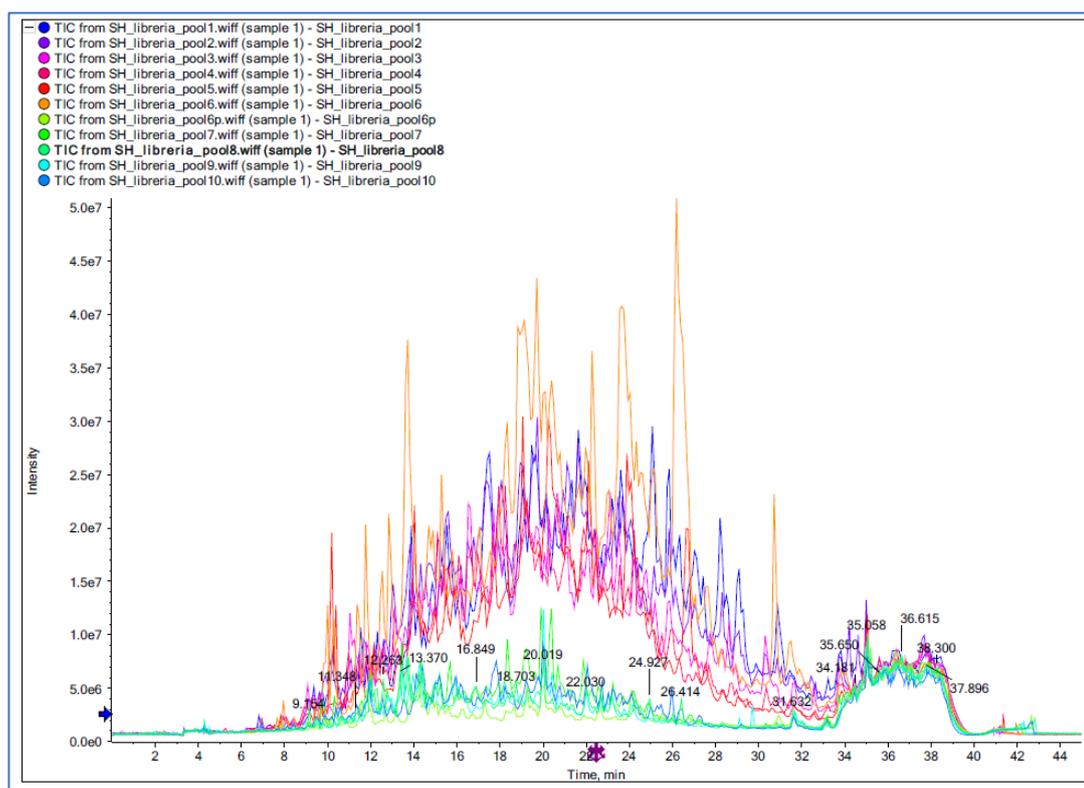


Figura 21: Total de iones cuantificados para el pool de muestras utilizados para construir la librería.

Los parámetros por defecto de ProteinPilot (v.5.0) se emplearon para generar una lista directamente desde los archivos 5600 TripleTof wiff. Se usó el algoritmo de Paragon (115) para buscar la base de datos “Swissprot” (03.2018)

con los siguientes parámetros: especificidad a tripsina, , *cis*-alquilación, sin restricción de taxonomía, con configuración de búsqueda reforzada y corrección para detección de falsos descubrimientos (*del inglés false discovery rate, o FDR*) para proteínas. Para evitar usar la misma evidencia espectral en más de una proteína, las proteínas identificadas se agruparon, basadas en el espectro MS/MS mediante el algoritmo de ProteinPilot Progroup. Además, los datos obtenidos en este experimento se combinaron con todos los datos de plasma humano generados en el laboratorio hasta la fecha, para poder crear una biblioteca "Pan Serum Spectrum", y poder amplificar el número de proteínas representadas en la biblioteca desde 337 a 507.

C) Extracción, cuantificación y digestión de muestras individuales

Las muestras de pre-, aféresis y post ASCOT obtenidas de las pacientes fueron analizadas con el siguiente protocolo. De cada muestra, se delipidó 100µL mediante centrifugación (15 minutos y a 15000xg, a 5°C), y 85 µL de este serum delipidado fueron precipitados con EtOH (concentración final del 40%, para desechar la seroalbúmina humana (igual que se ha descrito previamente). Los "pellets", disueltos con 100 µL de tampón de TEAB (*del inglés Tetraethylammonium bromide* o tetraetilamonio bromuro) (0.5M TEAB with 4M Urea and 2% SDS), y las soluciones finales se cuantificaron con un ensayo cuantificador de proteínas Machery-Nagel, ref. 740967.50), siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras (25 µg) fueron cargadas en geles 1D PAGE e incubados por la noche a 37°C con 500ng de tripsina (Promega), para su digestión enzimática, tal y como se ha descrito previamente. Así mismo, la digestión se interrumpió con trifluoroacético al 20%, y el sobrenadante se eliminó previo a deshidratar los geles con acetonitrilo puro. Las soluciones pépticas se secaron en una centrifuga al vacío, y se resuspendieron en 50 µL 2% de acetonitrilo, 0.1% de trifluoroacético.

D) *Análisis LC-MS/MS y SWATH™ de muestras plasmáticas individuales.*

Las mezclas de péptidos digeridos (5 μ L), se cargaron en NanoLC Columns (3 μ C18-CL, 75 μ m \times 15cm; Eksigent Technologies) y fueron desaladas con trifluoroacético al 0.1% a 2 μ l/minutos durante 10 minutos. Las columnas analíticas (LC Column, 3 μ C18-CL, 75 μ m \times 12cm, Nikkyo) se equilibraron con solución de acetonitrilo (5% de acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico), previo a eluir los péptidos con un gradiente lineal de 5-35% de solución de acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico durante 30 minutos, a una tasa de flujo de 300 nL/min. Los péptidos se analizaron en una MS nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). El tripleTOF operaba en modo SWATH, en el que se realizaba un SCAN de 350–1250 m/z en ventanas definidas (3.05 segundos/ciclo).

Se emplearon 37 ventanas de SWATH, con 15Da de amplitud de ventana, desde 450 a 1000 Da. Las muestras individuales se randomizaron en bloques, y el total de iones fueron cuantificados.

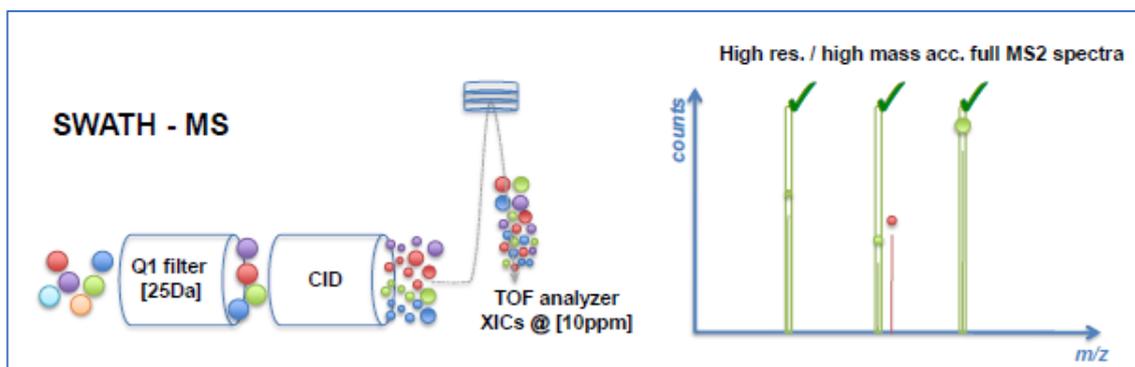


Figura 22: Esquema de funcionamiento de la técnica SWATH

Los archivos “wiff” creados, sea analizaron empleando Peak View 2.1 con la librería “Pan Serum Library”, previamente generada con el siguiente esquema:

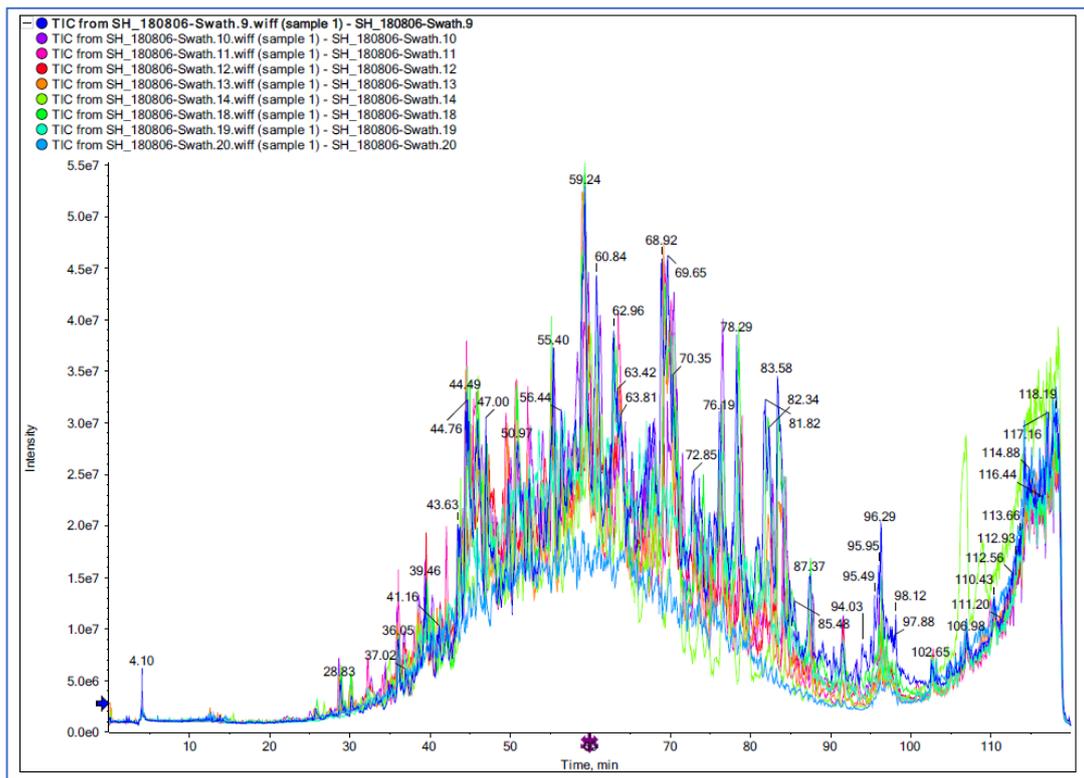


Figura 23: Total de iones cuantificados por muestra SWATH

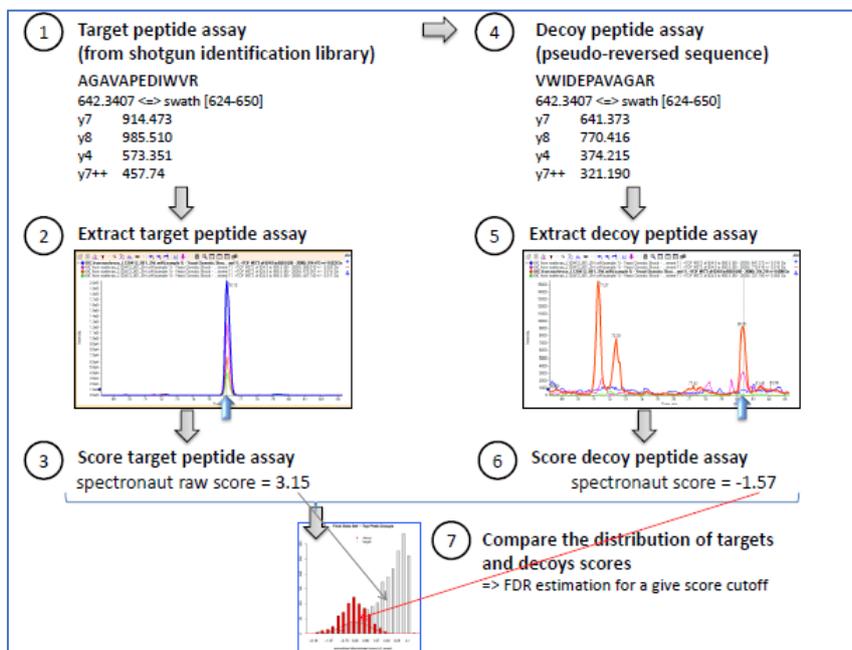


Figura 24: Proceso de generación de las muestras.



Los ajustes para el procesado de péptidos eran de la siguiente manera:

- 20 péptidos/proteínas.
- 6 transiciones/péptidos.
- 95% límite confianza por péptido/proteína.
- 1% FDR.
- Se excluyeron péptidos modificados.

Las opciones de XIC se fijaron en ventanas de extracción de 20 minutos y 50 ppm de amplitud para XIC.

Tras la detección de los péptidos, los tiempos de retención se realinearon utilizando los péptidos de alta confianza de la biblioteca, con una ventana de extracción XIC de 10 minutos. Utilizando estos parámetros, 296 proteínas se cuantificaron, mediante el Marker View (*Sciex*).

El área de las proteínas fue calculada y normalizada con la suma de todas las áreas de todas las proteínas cuantificadas.

Tras ello, se realizó un análisis estadístico de la reducción de dimensionalidad, con PCA (*del inglés "Principal component analysis"*), y DA (*del inglés, "discriminant analysis"*). Posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal para identificar las proteínas relevantes implicadas en los distintos perfiles entre muestras. Los parámetros seleccionados para el tiempo de ciclo de adquisición MS-MS/MS permitieron cuantificar el área de cada proteína con más de 8 puntos.

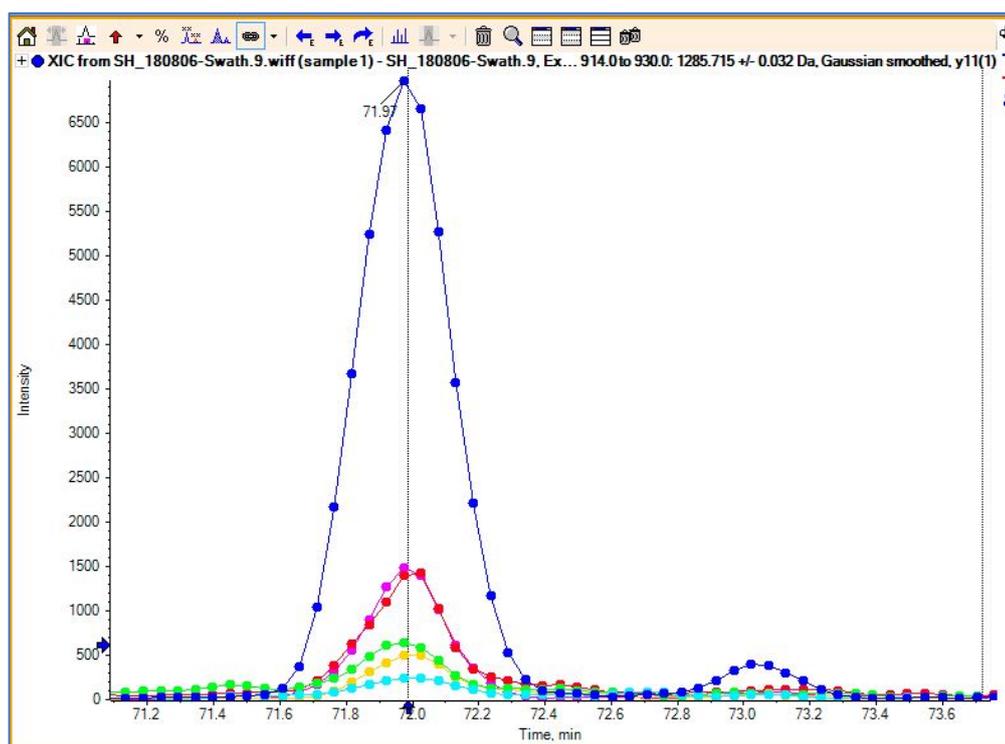


Figura 25: Área bajo de la curva de una de las muestras, que identifica las distintas proteínas. *A mayor intensidad, mayor concentración.*

3.1.9. Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como media aritmética con DE, o mediana y rango intercuartílico (IQR) según la distribución de los mismos. Se realizaron comparaciones de 2 en 2 mediante una tabla de contingencia, y empleando el “Mann-Whitney’s U test”, para evaluar los resultados entre ambos grupos. Posteriormente, para valorar los resultados de FIV antes de ASCOT y tras ASCOT de cada paciente, se empleó el “Wilcoxon signed rank test”. Las correlaciones entre las distintas variables se establecieron mediante el test de “Spearman”. Aquellos datos con una $p < 0.05$, se consideraron estadísticamente significativos.



Para las comparaciones múltiples, se empleo una “corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples”, en donde se consideraba significativo una $p < 0.0127$.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el software estadístico “SPSS 22.02 (IBM)”.





3.2. ASCOT POI (ASCOT-2): ASCOT y MOVILIZACIÓN G-CSF.

3.2.1. Diseño del estudio

El segundo ensayo clínico piloto, se llevó a cabo en pacientes con POI, tras finalizar el primer estudio. Se trataba de un estudio piloto prospectivo, que, a diferencia del primer estudio, era aleatorizado. Su objetivo era evaluar la eficacia de la movilización e infusión intraovárica de células de la médula ósea en la recuperación del ciclo menstrual y la foliculogénesis de pacientes POI. El tamaño muestral calculado también fue de 20 sujetos, al ser un estudio con pacientes con POI, en un proyecto de investigación en el que no existía experiencia al respecto.

Este estudio fue aprobado por El Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (CEIm La Fe 2017/0251) y registrado en Clinical Trials: NCT03535480.

La población del estudio prevista era de 20 pacientes diagnosticadas previamente de POI,(16) por la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario La Fe, todas ellas subsidiarias de tratamiento de FIV/ICSI a consecuencia de su esterilidad).

Los criterios de inclusión eran los siguientes:

- Edad igual o inferior a 38 años
- Presencia de amenorrea u oligoamenorrea durante al menos 4 meses
- FSH sérica superior a 25 IU/l
- AMH inferior a 5 pM
- Cumplir los criterios estándar para la donación autóloga de progenitores hematopoyéticos en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

En contra, los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Endometriosis ovárica
- Cualquier cirugía ovárica considerada un factor de riesgo de pobre respuesta o POI

- La presencia de factores genéticos asociados a pobre respuesta y POI (ej. Síndrome de Turner, premutaciones FMR1...)
- Condiciones adquiridas asociadas a pobre respuesta y POI (ej. Quimioterapia gonadotóxica, radioterapia...)
- Presentar un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30kg/m²
- Tener alergia al yodo o al contraste yodado
- Padecer insuficiencia renal
- Factor masculino severo por parte de la pareja de la paciente.

Todas las participantes entendieron, aceptaron, y firmaron, el consentimiento informado por escrito (*ver Anexo II*).

Este segundo estudio en pacientes con POI, a diferencia del primer estudio, se dividió en dos fases.

La primera fase, un *estudio piloto aleatorizado, controlado*, con veinte pacientes (10 por brazo) previamente diagnosticadas de POI acorde a los criterios establecidos, aleatorizadas a dos brazos de intervención.

El primer brazo de intervención (que a propósito de esta tesis doctoral recibirá el nombre de: Experimental-1, o movilización celular con G-CSF), consistía en movilizar las células madre desde médula ósea, tras administración previa G-CSF (BMDSC). En estas pacientes no se realizó aféresis ni posterior infusión celular en la arteria ovárica, con el objetivo de que las células movilizadas permaneciesen circulantes, y de esta forma, evaluar su capacidad de ir al ovario por sí solas. Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada en pacientes con patología endometrial para mejorar los resultados de las TRA así como en otros campos, sin el subsiguiente paso de re-infusión celular.

El segundo brazo (que a propósito de esta tesis doctoral recibirá el nombre de: Experimental-2, o ASCOT), consistía así mismo, en movilizar las células madre desde médula ósea, tras administración previa de G-CSF (BMDSC), pero posteriormente dichas células fueron aisladas en sangre periférica mediante aféresis, y tras ello, trasplantadas en uno de los dos ovarios, a través de la arteria ovárica (acceso desde la arteria femoral), siguiendo la

misma técnica realizada en el primer estudio piloto. Este trasplante celular ovárico, únicamente se realizó en uno de los dos ovarios de cada paciente, sirviendo por tanto el ovario contralateral como control. El ovario que se escogió para el trasplante celular dependía de las ventajas anatómicas que ofreciese cada paciente, para la realización del cateterismo intraarterial.

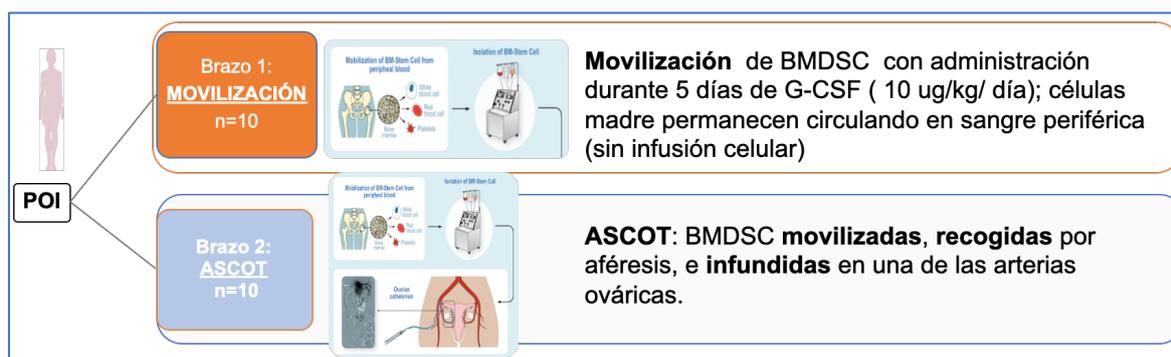


Figura 26: Los dos grupos de estudio de ASCOT-2. Las pacientes eran randomizadas de forma aleatoria a uno de los dos grupos.

La segunda fase del estudio era un estudio observacional prospectivo. Constituía de una cohorte con todas las pacientes que participaron en la fase 1, de ambos brazos experimentales, con seguimiento posterior en consultas de la Unidad de Reproducción de la Fe durante 6 meses.

El objetivo final de esta fase era valorar tasa de recuperación de la menstruación, AFC, niveles de FSH, estradiol y AMH, la tasa de gestación en ambos grupos, así como los parámetros relativos a la técnica de reproducción en caso de que la hayan requerido.

De la misma manera que en el estudio con pacientes POR, para entender e identificar los posibles cambios inducidos por las BMDSC, se llevaron a cabo diferentes estudios experimentales. Brevemente, se analizó la composición de los distintos tipos de células madre, así como de los factores específicos secretados por ellas, en ambas ramas del estudio (tanto movilización celular con G-CSF como ASCOT). Con ello también se trató de correlacionar la presencia

de dichos factores, con la variación en la reserva ovárica tras la terapia con BMDSC y como esto evoluciona previo y tras el tratamiento con células madre. En este segundo estudio se incluyó un análisis adicional del número de BMDSC en sangre periférica a los 7 días de finalizar la movilización. El principal objetivo de esto era valorar si el proceso de aféresis y posterior trasplante ovárico modificaba estos valores, dado que en las pacientes del brazo 1 no realizaban estas intervenciones, sino que las células se dejaban circulando.

En cuanto al perfil proteómico, en las pacientes POI, también se estableció en muestras del plasma durante el reclutamiento de todas las pacientes, tras la finalización de la movilización y 3 meses tras ASCOT, para así poder evaluar los cambios de las proteínas.

3.2.2. Tratamiento de las pacientes: Movilización de células madre desde médula ósea a sangre periférica

3.2.2.1. Movilización y selección de Células Progenitoras en Sangre Periférica (CPSP)

En ambas ramas del estudio, se realizó la movilización de células madre a sangre periférica desde médula ósea, siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito en detalle en el apartado *movilización células madre desde médula ósea 3.1.2.1. (página 52)* del estudio ASCOT-POR, y realizando los mismos estudios y analíticas previas. Posteriormente únicamente en las pacientes del brazo 2 (grupo ASCOT), se realizó además aféresis sanguínea y reinfusión celular en una arteria ovárica (detallado a continuación).

La técnica de movilización celular seguía el protocolo establecido por el servicio de hematología del Hospital La Fe de Valencia, tras la administración de G-CSF vía subcutánea, descrito previamente en el estudio en POR (*apartado 3.1.2.1*).

En las pacientes del brazo 1 (movilización celular), que no eran sometidas a aféresis, se tomó una muestra de sangre, para poder evaluar la eficacia de la

movilización y de esta forma poder realizar un recuento de las poblaciones celulares.

3.2.2.2. Aféresis y recolección celular.

A continuación, en las pacientes del brazo 2 (ASCOT), se llevó a cabo la recolección celular mediante aféresis, de la misma manera que en el primer estudio con POR (*descrito en el apartado 3.1.2.2. Recolección celular y aféresis, página 53*). Inmediatamente tras la recolección celular, se obtuvieron muestras del producto total recolectado, para realizar un estudio de la celularidad total y de las poblaciones celulares por medio de la citometría de flujo. Con ello se cuantificaron las células CD34+ y CD133+ recolectadas. En las pacientes del grupo 2 (ASCOT), el producto fue enviado al servicio de radiología intervencionista para su infusión posterior, siguiendo los procedimientos operativos estandarizados vigentes en la unidad. Se infundió el volumen de aféresis completo necesario para alcanzar 50×10^6 células CD133+ sin manipulación ni selección.

3.2.3. Cateterismo intraarterial

En la rama 2 del estudio (grupo ASCOT), se realizó el cateterismo intraarterial de una de las dos arterias ováricas. (técnica descrita en el estudio en POR, en el *apartado 3.1.4. Cateterización intraarterial, página 55*). Las pacientes habían sido previamente admitidas por parte del servicio de radiología intervencionista, comprobando que no cumplían criterios de exclusión. El tiempo entre la colección de las células por aféresis, hasta la infusión celular, fue menor de 24 horas en todos los casos.

3.2.4. Seguimiento de las pacientes

Tras los procedimientos descritos, se realizó un seguimiento de la función ovárica de las pacientes y de la recuperación del ciclo menstrual. Inicialmente,

justo antes del inicio del tratamiento, se delimitaron los niveles basales de FSH, estradiol y AMH, así como del AFC para cada una de las pacientes. Posteriormente, se determinaron los niveles séricos de AMH, FSH y E2 y AFC de forma semanal durante los primeros 15 días, y a continuación, de forma bisemanal hasta final del periodo de seguimiento (6 meses).

3.2.5. EOC, ICSI, y transferencia embrionaria

Durante el seguimiento, en aquellas en donde se evidenció una elevación de AFC (igual o superior a 1 folículo), se inició una estimulación ovárica controlada (EOC), seguida de captación ovocitaria posterior.

Para la EOC en las pacientes POI se emplearon distintos protocolos de estimulación, en función de las características de las pacientes o de la situación hormonal y ecográfica en el momento del comienzo del ciclo:

- Estimulación ovárica con bajas dosis de clomifeno (50 mg. vía oral) y HMG, esta última introducida en el cuarto día de estimulación y a días alternos, si los valores de FSH séricos de la paciente lo permiten. Con efectos de esta tesis doctoral, a este protocolo lo llamaremos “protocolo japonés”.
- Estimulación con bajas dosis de gonadotropinas, “mild” o suave, con HMG a días alternos o bajas dosis, que así mismo con efectos de esta tesis doctoral, a este protocolo lo llamaremos “protocolo mild”.
- Algunos ciclos se iniciaron en “ciclo natural”, esto es, tras evidenciar un folículo antral con crecimiento esporádico que provocaba un aumento puntual del estradiol.
- En ocasiones se optó por un “ciclo convencional”, con dosis estándares de HMG.

Tras la EOC, se siguieron los mismos procedimientos para la punción ovárica e ICSI, ya descritos para el estudio realizado en pacientes POR (Estudio 1, apartado 3.1.6.1. *Estimulación ovárica e ICSI, página 57*). Los ovocitos

obtenidos tras la punción fueron fecundados con semen de la pareja de la paciente o semen de donante, en función de la indicación médica (la calidad seminal), mediante ICSI. Se compararon los resultados obtenidos entre los dos brazos del estudio.

Los embriones resultantes fueron estudiados y clasificados mediante criterios morfológicos clásicos establecidos por ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción). Dichos embriones, fueron vitrificados con el objetivo de acumularlos y maximizar las opciones durante el tiempo de posible respuesta positiva del ovario tras la intervención realizada. Los embriones con mayor potencial evolutivo fueron transferidos al útero, en día 5 de desarrollo embrionario, con fines reproductivos tras resultar ser sanos (categorías A-C). Para la transferencia embrionaria en ciclo sustituido, se administraron estrógenos vía transdérmica (Evopad, 150 mg, Janssen-Cilag ®) durante alrededor de 12 días, y posteriormente se añadió progesterona (600 mg/día, Progeffik, Effik ®, o utrogestan SEID ®) (*ya descrito en el apartado 3.1.6.3. Transferencia embrionaria, para pacientes POR, página 59*).

3.2.6. Estudios experimentales

Tal y como se ha descrito anteriormente en el estudio 1, en este caso también se realizaron una serie de estudios experimentales con el objetivo de evaluar los efectos inducidos por la movilización o trasplante (ASCOT) de BMDSC a diferentes niveles.

En primer lugar, se realizó el análisis de las diferentes poblaciones celulares en el momento de la movilización (día 5 G-CSF) en ambos brazos de estudio. En este caso, dado que las pacientes del grupo 1 no existía aféresis, el análisis se realizó en la muestra de sangre periférica que se extrajo a todas las pacientes que realizaron la movilización, para evaluar si habían completado con éxito el proceso. Este es un paso previo a la aféresis cuando esta se realiza. El protocolo llevado a cabo para el análisis se explica con detalle en el *apartado 3.1.3. Análisis de las poblaciones celulares de la aféresis (página 54)*. Esta

misma determinación se repitió en pacientes de ambos brazos a los 7 días sobre muestras de sangre periférica para evaluar la influencia del proceso de aféresis y trasplante sobre los niveles de BMDSC circulantes.

Sobre el plasma obtenido en estas determinaciones celulares se llevo a cabo la determinación de la concentración de los factores de crecimiento secretados por las células madre con el objetivo de comparar si existía alguna correlación con el posible efecto positivo observado en ovario o con el brazo de estudio asignado. Para ello se utilizó el mismo protocolo descrito para las POR del estudio 1 aunque en este caso únicamente se determinaron las concentraciones de los factores que habían mostrado ser relevantes en el estudio 1: THSP-1 y FGF-1 (*ver sección “Cuantificación de factores solubles secretados por BMSDC en aféresis 3.1.7., página 59*).

Finalmente, los efectos sistémicos del tratamiento según el brazo de estudio se evaluaron en muestras de plasma obtenidas PRE, en día aféresis (o fin movilización) así como en muestras obtenidas 3 meses después de la intervención. Para ello se llevo a cabo el protocolo experimental y análisis descritos en el apartado “3.1.8. Análisis perfil proteómico en muestras de plasma de pacientes mediante SWATH LC/MS” (*página 62*). El análisis posterior de los perfiles proteómicos se realizó mediante PCA y DA, con la particularidad de que en este caso se diferenciaron muy claramente, para su posterior comparación, las muestras POST, ya que este punto de análisis es el que mostrará la influencia del paso de trasplante ovárico en los efectos observados, así como la capacidad de las BMDSC de llegar por si solas a los territorios dañados como el ovario en este caso.

3.2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico en este segundo estudio se realizó de forma idéntica al primer ensayo con pacientes POI (*sección 3.1.9., análisis estadístico*), con la diferencia que en este caso se trata de un análisis interino realizado a mitad ensayo.

Los datos también se presentaron o bien como media aritmética con DE, o como mediana e IQR.

Para evaluar los resultados entre ambos grupos, se empleó el “Mann-Whitney’s U test”, y se hicieron comparaciones de 2 en 2. Se usó el “Wilcoxon signed rank test”, para valorar los resultados reproductivos de cada paciente. Para correlacionar las distintas variables del estudio, se empleó también el test de “Spearman”, considerando como estadísticamente significativo los datos con una $p < 0.05$. Para comparaciones múltiples, se utilizó la “corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples” (estadísticamente significativo $p < 0.0127$). Así mismo, se empleó el software estadístico “SPSS 22.02 (IBM)”, para realizar todos los análisis estadísticos.



4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ASCOT POR (ASCOT-1)

4.1.1. Características de las pacientes.

Fueron un total de 20 pacientes POR las que fueron reclutadas en el estudio a pesar de que como se detalla más adelante, solo 19 completaron la primera parte del estudio y 18 el estudio completo.

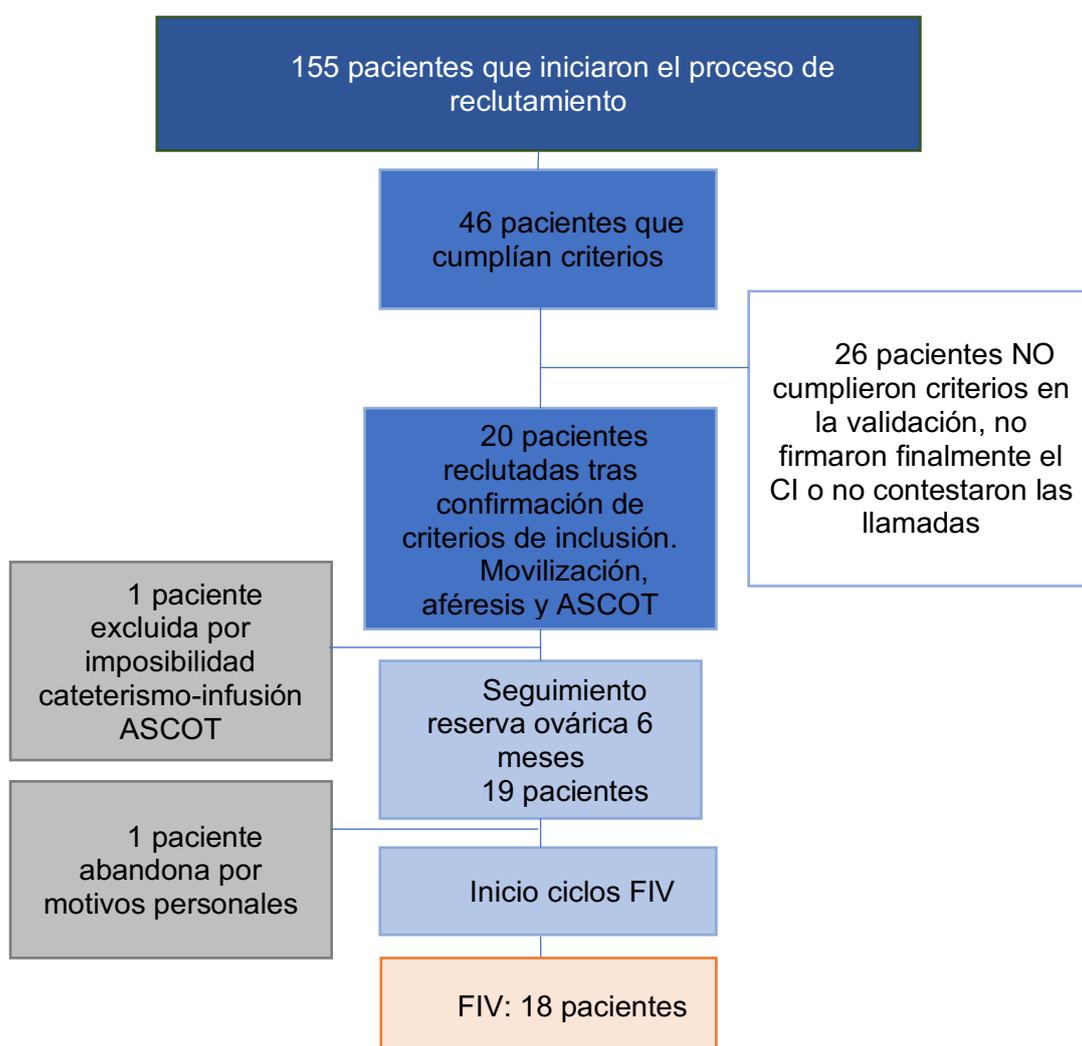


Figura 27: Proceso de reclutamiento de las pacientes POR en ASCOT-1.

En la figura se observa el flujo de trabajo, desde el inicio del reclutamiento, y el paso de las pacientes a través de las diferentes fases del estudio hasta alcanzar las 20 pacientes finalmente reclutadas, y aquellas que llegaron a realizar ciclos de FIV.

La edad de dichas pacientes previo al tratamiento con ASCOT era de 36.0 \pm 1.7 años, y su IMC era de 24.9 \pm 2.9, con un peso de 62,6 kg. La edad de las parejas también era de 36 \pm 4.2 años, y aportaban un seminograma basal, imprescindible para poder ser reclutadas en el estudio.

En el reclutamiento, las pacientes presentaban una media de 3 años de infertilidad, y 2 ciclos de FIV por paciente tras el diagnóstico de baja reserva, sin embargo, si tenemos en cuenta también todos los ciclos previos al diagnóstico, estas pacientes habían realizado un total de 50 ciclos de FIV-ICSI y 12 IA (inseminación artificial) previos al inicio de la terapia con ASCOT sin conseguirse gestación en ningún caso. Todos estos ciclos fueron “ciclos convencionales”, con dosis estándares de gonadotropinas.

Previo al inicio del estudio, presentaban un AFC de 2.9 \pm 1.4 folículos, un valor sérico de AMH de 2.0 \pm 0.7 pM y FSH pituitaria 10 IU/mL (*Tabla 2*).

| Parámetro | Características basales |
|---|---|
| Edad de la paciente (años) | 36.0 [34-37] |
| Edad de la pareja (años) | 36.0 [35-40] |
| Diagnóstico de la pareja (seminograma) | normozoospermia 53.3% oligospermia 20.0% astenozoospermia 20.0% azoospermia 6.6% |
| Años de infertilidad desde el diagnóstico | 3.0 [2.0 – 4.0] |
| Ciclos FIV-ICSI (n) | 2 [1 – 2] |
| 1 | 8 |
| 2 | 7 |
| ≥ 3 | 4 |
| Sin información o IA | 1 |
| IMC (Kg/m ²) | 24.0 [23.0 – 25.0] |
| FSH (IU/ml) | 10.1 [9.3 - 14.5] |
| AFC | 3.0 [0.0 - 5.0] |
| AMH (pM) | 1.0 [0.9 - 3.0] |

Tabla 2: Características basales de las pacientes POR. No se incluyen los datos de ciclos previos realizados antes de ser diagnosticadas como POR. Los datos de la tabla se expresan como mediana, y entre paréntesis el IQR.

4.1.2. Técnica ASCOT

Todas las pacientes llevaron a cabo con éxito el proceso de movilización de las células madre desde la médula ósea. Los únicos efectos adversos observados debido al tratamiento con G-CSF, fueron, por un lado, cefalea en una de las pacientes, que se resolvió con paracetamol vía oral. En una segunda paciente, se evidenció febrícula, dolor a nivel de hipocondrio izquierdo (bazo), y dolor óseo.

De forma previa a la aféresis, para confirmar que el proceso de movilización se ha completado con éxito, se determinó la concentración de células CD34+ en sangre, con un valor de 80.1 ± 32.0 células por/ μL , lo que indica que las pacientes habían llegado al mínimo necesario para proceder a la aféresis. En el grupo de POR, en todas las pacientes se alcanzó el límite de células movilizadas a sangre periférica de 4×10^6 CD34 +células por kg, el valor establecido para considerar que la movilización había sido efectiva (*tabla 3*).

En cuanto al procedimiento de aféresis, se llevó a cabo de forma satisfactoria en todas las pacientes con un volumen sanguíneo filtrado durante aféresis que fue de 4001.7 ± 1175.0 ml. Del volumen filtrado, se recolectó por aféresis $97.7 \text{ ml} \pm 32.6 \text{ ml}$, siendo el tiempo de recolección celular de 122 minutos (*tabla 3*).

El procedimiento de infusión celular mediante cateterismo se llevó a cabo con éxito en todas las pacientes reclutadas, salvo en una de ellas. Dicha paciente presentó una reacción adversa durante el cateterismo, sufriendo un vasoespasmó, y por tanto tuvo que interrumpirse el procedimiento que imposibilitó que se infundiese la dosis celular completa. La paciente, por ello, fue retirada del estudio y por lo tanto solo realizaron el posterior seguimiento 19 pacientes. El volumen medio infundido por paciente en arteria ovárica mediante cateterismo fue de $40.4 \pm 12.3 \text{ mL}$.

| VARIABLES DE LA AFÉRESIS | Media ± DE | Mediana |
|---|-------------------|----------------|
| Peso de las pacientes (kg) | 61.7 ± 10.5 | 64.0 |
| Volumen filtrado (mL) | 4001.7 ± 1175.0 | 4394.0 |
| Volumen recolectado (mL) | 97.9 ± 32.6 | 100.0 |
| Volumen infundido (mL) | 40.4 ± 12.3 | 40.5 |
| Tiempo de recolección (min) | 122 ± 49 | 112.0 |
| Pre-aféresis CD34+/μL | 80.1 ± 32.0 | 78.9 |
| Aféresis CD34+/μL | 1822 ± 834 | 1616.0 |
| Aféresis células CD34+ (%) | 0.8 ± 0.2 | 0.8 |
| Aféresis células CD133+ (%) | 0.6±0.2 | 0.7 |
| Células CD133+ infundidas ($\times 10^6$) | 49.0 ± 8.9 | 50.6 |
| Factor de concentración de la aféresis | 23.7 ± 7.3 | 22.7 |

Tabla 3: Resumen de los parámetros de la aféresis. *Los datos se muestran como media±DE.*

4.1.3. Composición celular del injerto

Dentro del conjunto total de células madre derivadas de médula ósea, existen distintas subpoblaciones celulares con un impacto variable sobre el éxito de la técnica ASCOT, además de distinta capacidad de injerto. Para ello, analizamos todas las muestras de aféresis empleando distintos marcadores del linaje hematopoyético (BMDSC: CD34+, CD133+; Células diferenciadas: CD45+).

La movilización con G-CSF incrementó casi 24 veces la presencia de BMDSC en sangre periférica, detectándose en todos los casos más de 10,000 células CD34+/mL. Respecto al total de células mononucleares presentes en la aféresis, la población de células madre hematopoyéticas CD34+ representó un 0.8 ± 0.2% y la de CD133+ un 0.6 ± 0.2%.

Al estudiar la coexpresión de marcadores, observamos que la mayoría de las células CD133+ viables también expresaban el marcador CD34+, representando las células CD133+CD34- (las más indiferenciadas dentro de la médula ósea) solo un $2.1 \pm 1.4\%$ del total de CD133+ viables. Por otro lado, el $98.2 \pm 1.5\%$ de las células CD133+ viables mostraron una expresión baja del marcador leucocitario común CD45 (CD45+), indicando que pese que se trataban de células monocíticas, las células derivadas de médula ósea aún no habían realizado la diferenciación hacia leucocitos. De hecho, solo un $1.7 \pm 1.2\%$ de las CD133+ viables pudo ser clasificada como leucocitos en base a su fuerte expresión del antígeno CD45 (CD45++).

Tras esta cuantificación se procedió a calcular el volumen necesario para infundir unos 50 millones de CD133+ por paciente, lo que dio lugar a que, del total de células infundidas en la arteria ovárica, $49.0 \pm 8.9 \times 10^6$ células eran CD133+.

En un análisis posterior, realizado tras la finalización del periodo de seguimiento de las pacientes, evaluamos si existía alguna relación entre la proporción de las distintas poblaciones celulares presentes en la aféresis y el incremento en los biomarcadores de reserva ovárica tras el trasplante de BMDSC. En dicho análisis no obtuvimos ningún resultado estadísticamente significativo, no detectándose diferencias en el porcentaje de las distintas poblaciones celulares entre las pacientes que mostraron una respuesta positiva al tratamiento y las que no, tal y como se puede observar en la Tabla 4. Esto pone de manifiesto que ninguna de las poblaciones individuales es la responsable per se del efecto observado, sugiriendo que todas ellas en su conjunto contribuyen al efecto positivo evidenciado, o que el marcador correspondiente a la posible población candidata no ha sido detectado en este análisis.

| Población celular | AMH | | AFC | |
|-------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|
| | Respuesta positiva | No respuesta | Respuesta positiva | No respuesta |
| CD34+ | 0.8 ± 0.2 | 0.8 ± 0.2 | 0.8 ± 0.3 | 0.8 ± 0.2 |
| CD133+ | 0.6 ± 0.2 | 0.7 ± 0.2 | 0.6 ± 0.3 | 0.6 ± 0.2 |
| CD133+CD34+ | 98.0 ± 1.1 | 97.7 ± 0.1 | 97.7 ± 1.3 | 98.1 ± 1.5 |
| CD133+CD34- | 2.0 ± 1.1 | 2.3 ± 2.1 | 2.3 ± 1.3 | 1.9 ± 1.5 |
| CD133+CD45++ | 1.6 ± 1.1 | 1.9 ± 1.7 | 1.9 ± 1.6 | 1.5 ± 0.8 |
| CD133+CD45+ | 98.4 ± 1.1 | 97.7 ± 2.4 | 97.9 ± 2.0 | 98.5 ± 0.8 |

Tabla 4: Composición celular de la aféresis. Se muestran las poblaciones de BMDSC CD34+ y CD133+ como porcentaje respecto a la celularidad total de la aféresis. Por otro lado, las subpoblaciones de células CD133+ se muestran como porcentaje respecto al total de células CD133+ viables. No se detectaron diferencias en la composición celular de la aféresis entre las pacientes que respondieron positivamente al trasplante de BMDSC y las que no mostraron respuesta al mismo. Los datos se muestran como media ± DE.

4.1.4. Reserva ovárica

Para monitorizar la reserva ovárica de cada paciente y la respuesta a la técnica ASCOT, se utilizaron como marcadores el AFC (medido por ecografía transvaginal) y la hormona AMH sérica. Ambos marcadores fueron obtenidos en condiciones basales, al inicio del estudio, y tras la técnica ASCOT, fueron monitorizada en cada visita de control del estudio.

El recuento basal medio de folículos antrales (previo a la técnica ASCOT) era de 3.7 ± 1.5 , evidenciándose un ascenso progresivo entre los días 8 y 22, que fue significativo en día 15 tras la técnica ASCOT, con un AFC de 5.0 ± 2.6 (5.0) ($P=0.031$)(Tabla 5). Debido a la gran variabilidad observada entre las pacientes, a pesar de detectarse aumentos en el AFC en otros puntos del

seguimiento, estos no fueron estadísticamente significativos, por ello decidimos realizar un análisis individualizado de la respuesta.

| Tiempo tras ASCOT | AMH (pmol/l) | AFC TOTAL | AFC Ovario control | AFC Ovario tratado |
|--------------------|---------------|------------------|--------------------|--------------------|
| Nivel basal | 0.8±0.6(1.9) | 3.7 ± 1.5 (3.5) | 1.8±1.0(2.0) | 2.1±0.9 (2.0) |
| D+2 | 2.2±1.7(2.0) | 4.5 ± 2.1 (4.5) | 3.0±2.0(3.0) | 1.5±0.7(1.5) |
| D+4 | 2.5±1.8 (2.0) | 4.3 ± 1.1 (5.0) | 2.7±1.5(3.0) | 1.7±0.6 (2.0) |
| D+6 | 2.0±1.3 (1.9) | 2.5 ± 2.1 (2.5) | 2.0±2.8(2.0) | 0.5±0.7 (0.5) |
| D+8 | 2.0±1.5 (2.3) | 5.7 ± 3.3 (5.5) | 3.3±2.1(4.0) | 2.3±1.8 (2.5) |
| D+11 | 2.0±1.5 (2.1) | 5.0 ± 3.0(5.0) | 2.3±2.1(3.0) | 2.7±1.2(2.0) |
| D+13 | 2.0±1.5 (2.0) | 5.5 ± 5.0(5.5) | 2.5±3.5(2.5) | 3.0±1.4(3.0) |
| D+15 | 2.1±2.1 (2.2) | 5.5 ± 2.6(5.0) * | 2.5 ± 1.9(2.5) | 3.0±1.8(2.5) |
| D+22 | 2.1±2.2 (1.4) | 5.7±2.7(6.0) | 2.5±1.9(2.5) | 3.2±1.5(3.5) |
| D+29 | 1.8±1.4 (1.6) | 3.6±2.1(4.0) | 1.7±1.1(2.0) | 1.9±1.5(1.0) |
| D+36 | 1.8±1.5 (1.4) | 4.4±1.5(5.0) | 2.8±1.5(3.0) | 1.6±0.5(2.0) |
| D+43 | 1.6±1.3 (1.0) | 7.0±1.0(7.0) | 3.3±1.2(4.0) | 3.7±0.6(4.0) |
| D+71 | 0.9±0.6 (0.7) | 3.0±1.4(4.0) | 1.6±0.7(2.0) | 1.8±0.9(2.0) |
| D+92 | 2.5±2.8 (1.3) | 5.4±2.4(5.0) | 2.6±1.7(2.5) | 2.8±1.3(2.5) |
| D+134 | 1.7±1.6 (1.4) | 3.2±2.1(2.5) | 1.0±0.6(1.0) | 2.2±1.7(2.0) |
| D+162 | 1.8±1.8 (1.6) | 5.0±1.6(5.0) | 2.4±1.4(2.0) | 2.6±1.3(2.0) |

Tabla 5: Seguimiento de los biomarcadores de reserva ovárica tras ASCOT. Hormona Antimülleriana (AMH), recuento de folículos antrales totales (AFC), AFC ovario control y AFC ovario tratado. Los datos se muestran como media ± DE (Mediana). * p<0.05 vs. Basal.

Al comparar entre pacientes, se constataron variaciones individuales en el incremento de AFC, existiendo una oleada en donde ascendía el AFC entre la primera y cuarta semana post ASCOT, y una segunda oleada unos 3 meses tras el tratamiento, destacando el aumento del AFC total observado en día 43 y día 92 tras ASCOT (Figura 28).

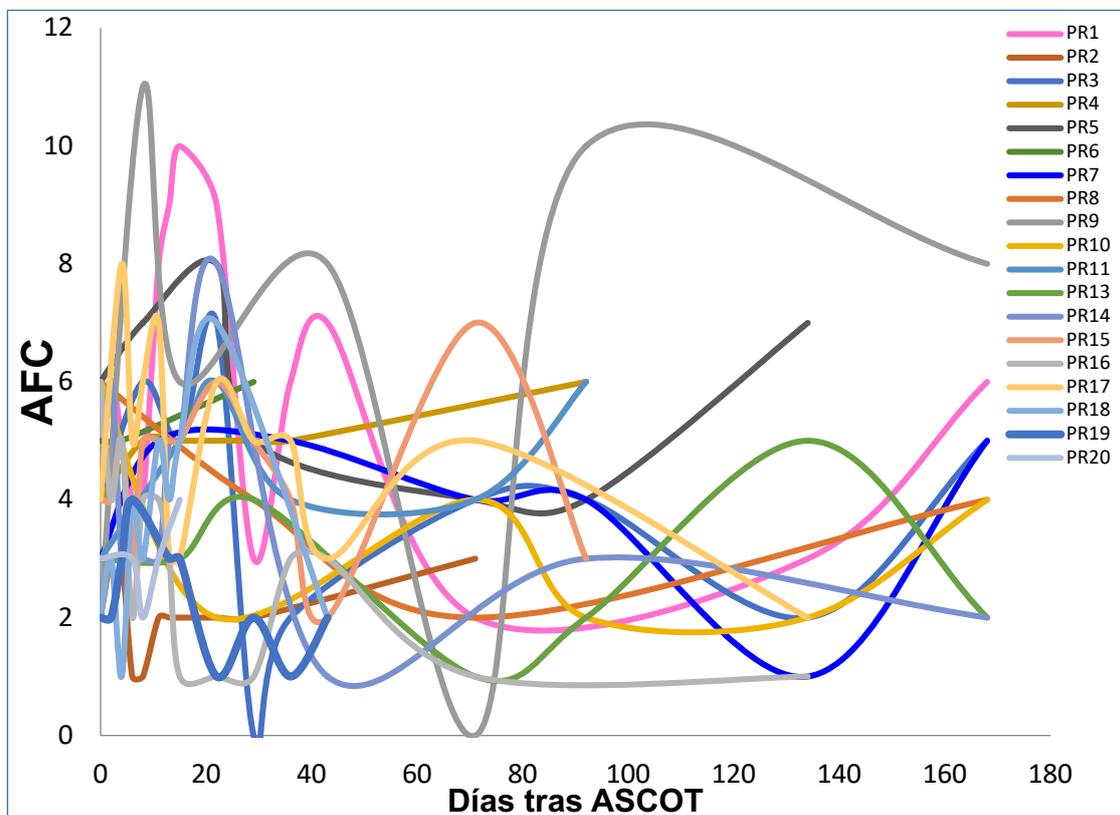


Figura 28: Progresión individual de recuento de folículos antrales (AFC). En la figura se muestra la progresión individual de cada paciente del AFC, a lo largo de todo el seguimiento. Cada color representa una paciente distinta.

Al comparar el incremento en AFC, entre el ovario control y el ovario tratado, no se evidenciaron diferencias significativas, observándose por otro lado, un ascenso progresivo en ambos ovarios (tabla 5).

Tras analizar el incremento de los valores de AMH individualmente, pese a que se evidenció un aumento progresivo tras ASCOT, dicho aumento no fue significativo ($p=0.14$) debido a la gran variabilidad observada entre las pacientes. De la misma manera que el AFC, la AMH alcanzó su valor máximo alrededor del día 15 post ASCOT (2.15 ± 2.1 pmol/L) (tabla 5). Sin embargo, se observaron

variaciones individuales entre las distintas pacientes, siendo los niveles heterogéneos. En 36.8% de las pacientes, se objetivó un llamativo ascenso de AMH durante las cuatro primeras semanas post ASCOT. Algunas pacientes mostraron un segundo ascenso posterior entre los días 80-130 tras la infusión celular, después de este primer ascenso inicial (*figura 29*).

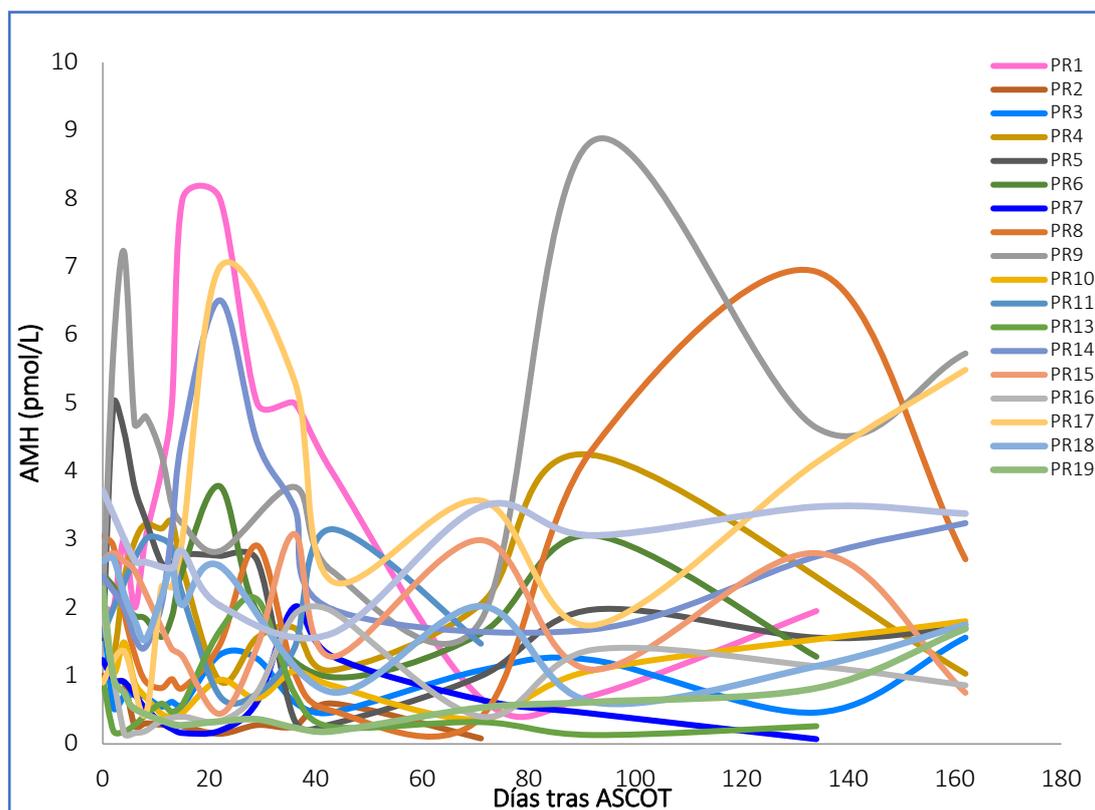


Figura 29: Progresión individual de hormona Antimülleriana (AMH). *En la figura se muestra la progresión individual de cada paciente de la hormona AMH, a lo largo de todo el seguimiento. Cada color representa una paciente distinta.*

Dado que existía mucha variabilidad entre pacientes, se decidió establecer un criterio de éxito de la técnica y respuesta positiva a ASCOT. Se consideraba que había una respuesta positiva a ASCOT cuando se evidenciaba un aumento en el AFC de 3 o más folículos antrales, y/ o un incremento de 2 DE en el valor de la hormona AMH (en dos determinaciones consecutivas), en comparación con los parámetros basales establecidos justo antes del inicio del tratamiento con G-CSF para la movilización de células madre.

Según estos criterios, y considerando ambos marcadores, se advirtió una respuesta positiva tras ASCOT con una mejoría de la reserva ovárica, en 14 de 19 pacientes (74 %) (*figura 30*). Sin embargo, la mejoría de ambos marcadores se observó en únicamente 6 pacientes (34.6%). En las otras 7 pacientes en las que se evidenció un incremento de la reserva ovárica, dos de ellas fue a partir de un incremento del AFC (15.8%), y cinco de ellas a partir de una mejora de los niveles de AMH (26.3%). En un 26% de las pacientes no se observó mejoría de la reserva ovárica tras ASCOT.

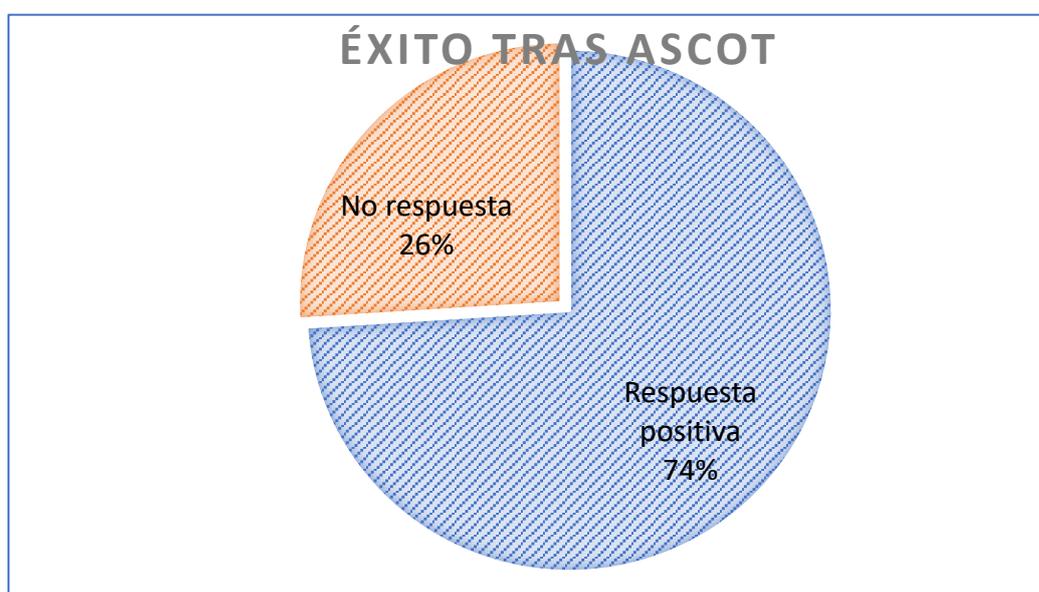


Figura 30: Respuesta positiva a ASCOT (AMH y AFC). Se muestra la respuesta positiva tras ASCOT, considerando ambos biomarcadores de reserva ovárica, en donde un 74% de las pacientes presentó una mejoría.

4.1.5. Factores de crecimiento solubles liberados tras ASCOT

Tras la técnica ASCOT, se realizó la cuantificación de factores de crecimiento solubles liberados por las células madre al plasma de la aféresis, tanto en aquellas pacientes que habían presentado una mejora de la reserva ovárica como en aquellas pacientes que no. Aquellas pacientes que presentaron una respuesta positiva, mostrando una elevación de AMH

($p=0,03$), y AFC ($p=0.004$), se evidenció un incremento en la concentración de FGF- 2. En cuanto a la concentración de THSP-1, fue significativamente mayor en pacientes con una respuesta positiva de AMH tras ASCOT ($p=0.049$), y además se demostró una correlación positiva con el incremento de AFC. ($r. 0.98, P<.01$)(Figura 31). Por otro lado, el PDGF-BB, y el IGF-1, tras ser analizados previo a la técnica ASCOT y post técnica ASCOT, no se evidenciaron correlaciones significativas con las variaciones en el AFC y AMH.

| Parámetro | AMH | | AFC | |
|-----------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| | <u>Respuesta Positiva</u> | <u>No respuesta</u> | <u>Respuesta Positiva</u> | <u>No respuesta</u> |
| FGF-2 (pg/mL) | 21.3 ± 4.7 | 15.2±1.4 | 34.9±4.7 | 14.8±1.5 |
| PDGFBB (pg/mL) | 1440.9 ± 937.4 | 681.8±423.1 | 428.1±948.9 | 701.1±418.5 |
| IGF-1 (ng/mL) | 35.1±12.5 | 30.8±9.4 | 34.1±13.6 | 32.3±7.3 |
| THSP-1 (ng/mL) | 3512.4±2276.9 | 785.8±370.0 | 2722.2±1351.2 | 2352.1±1953.5 |

Tabla 6: Concentración plasmática en aféresis de los factores solubles en pacientes POR, que presentaron una respuesta positiva o una no respuesta tras ASCOT. Se representa tanto la hormona AMH como AFC, y su relación con los factores solubles.

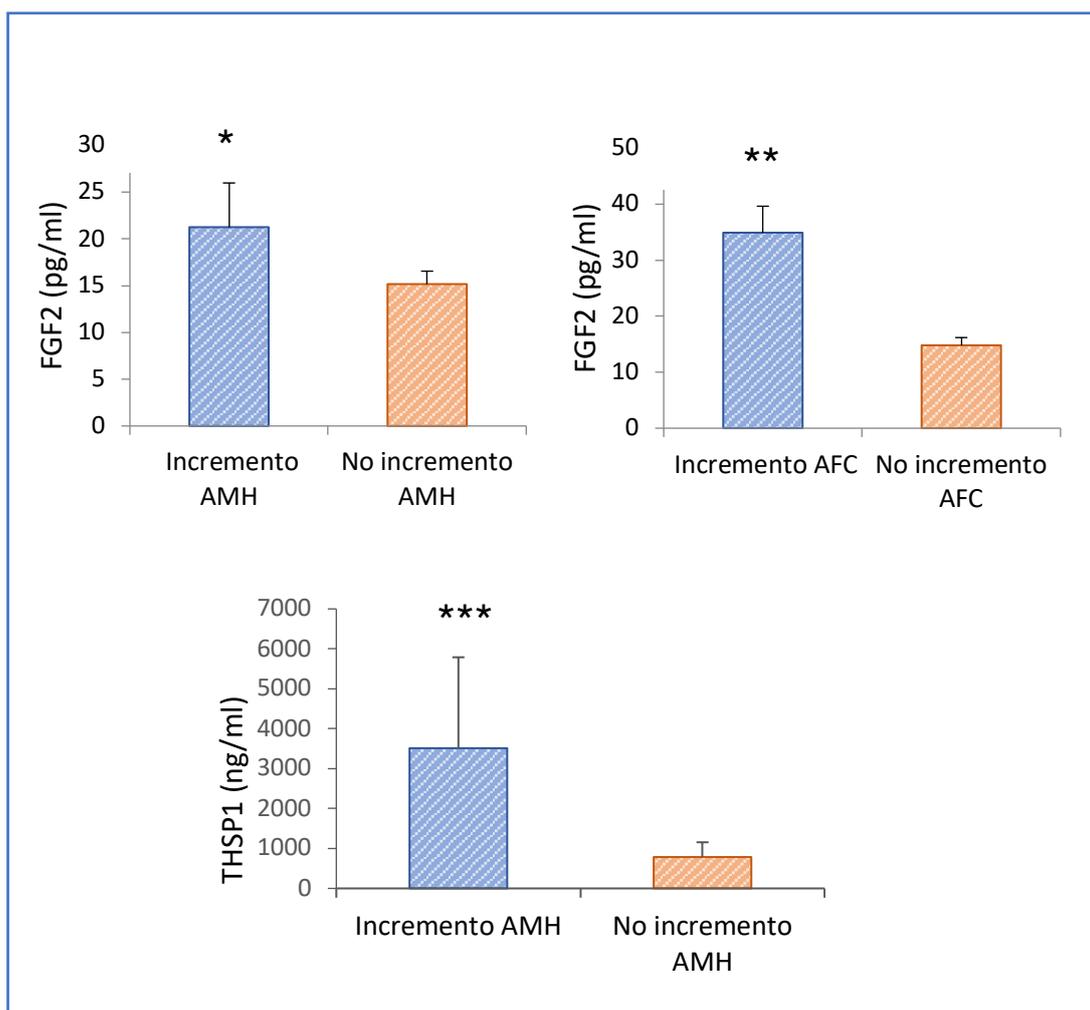


Figura 31: Correlación positiva entre los factores solubles y los biomarcadores de reserva ovárica. La concentración de FGF-2 fue mayor en aquellas pacientes en la cuales se evidenció un incremento tanto de AMH (* $p=0.03$) como de AFC (** $p=0.004$). La concentración de THSP-1 fue significativamente mayor en pacientes con un incremento de AMH tras ASCOT (** $p=0.049$).

4.1.6. Resultados FIV y reproductivos.

Un total de 19 pacientes iniciaron esta fase del estudio, sin embargo, solo 18 de ellas completaron la fase del estudio en la que se realizaban ciclos de FIV tras la técnica ASCOT, ya que una de ellas abandonó el estudio durante esta fase.

Previo a someterse a la técnica ASCOT, las 18 pacientes del estudio, habían realizado un total de 30 ciclos de FIV-ICSI tras recibir el diagnóstico de baja respuesta, con una media de 2 ciclos por paciente. Siete pacientes habían realizado un solo ciclo, otras ocho pacientes habían realizado 2 ciclos, y dos pacientes habían llegado a realizar 3 o más ciclos, una última paciente había realizado únicamente IA como TRA previos. El AFC el día de inicio de la EOC fue de 3 folículos antrales, con una media de 3 folículos puncionados (*tabla 7*).

Tras la técnica ASCOT, se realizaron 34 ciclos, una media de 79 días tras realizar la técnica ASCOT (entre los días 31 y 109) siendo la media de iniciación del primer ciclo a los 47 ± 45 días tras ASCOT. El número de ciclos realizados por paciente también fue de 1.88 ± 0.96 ciclos: en 8 pacientes se realizó un solo ciclo, en 5 pacientes se realizaron dos ciclos, y en cinco pacientes se realizaron 3 o más ciclos (*tabla 7*). El AFC el día de inicio de la EOC era de 4.63 ± 2.39 folículos, finalizando el ciclo con una media de 3 ± 1.7 folículos puncionados.

Cuando comparamos los ciclos FIV previos con los realizados tras ASCOT, encontramos que la dosis de gonadotropinas total administrada fue ligeramente mayor tras ASCOT, y aunque la duración de la estimulación fue menor, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los valores de estradiol el día del “triggering con HCG”, fueron mayores también en los ciclos de FIV pre-ASCOT, sin impacto significativo (*tabla 7*).

Al ser comparar los resultados previos a la técnica a ASCOT con los resultados de FIV post ASCOT, se evidenció una mejoría de las siguientes variables:

De las 18 pacientes que completaron el estudio, solo 17 habían realizado ciclos de FIV-ICSI previos a ASCOT, ya que una de ellas únicamente había realizado IA como TRA. De los intentos FIV-ICSI, se llegó a realizar punción folicular en un 70.8% de los ciclos, obteniendo ovocitos en estado de MII solo en el 54.2% de los ciclos, y embriones en un 50% de las mismos. Se obtuvo una media de un embrión por ciclo. La suma total de ovocitos obtenidos fue de 39 MII, 26 de los cuales fecundaron y llegaron a embrión. Al ser evaluados en día 3 según criterios morfológicos, se consideraron como embriones de buena calidad

13 de los 26 embriones, sin embargo, solo se transfirieron 11 de ellos ya que dos no llegaron a blastocisto, sin obtener gestación. La tasa de cancelación de ciclos de FIV fue de 36.6%, lo cual significa en 11 de los 30 ciclos iniciados.

En los ciclos de FIV realizados a estas 18 pacientes tras la técnica ASCOT, se llegó a efectuar la punción en un 82.3% de los ciclos iniciados (28 de 34). La tasa de cancelación post ASCOT fue solo del 17.6%, es decir en 6 de los 34 ciclos iniciados, siendo dicha reducción estadísticamente significativa ($p < 0.001$; *tabla 7*). Se obtuvieron ovocitos MII en un 76.5% de los ciclos, y embriones en un 61.8% (21 de los 34 ciclos). El número total de ovocitos en MII obtenidos fue de 57, con 40 embriones (tras realizar la técnica ICSI).

Un 60% de estos embriones fueron clasificados en día 3 como calidad A/B según criterios morfológicos (calidad óptima), 38 de los mismos alcanzaron el estadio de blastocisto y se les realizó análisis genético (PGT, *del inglés "preimplantation genetic testing"*), sin embargo, únicamente 7 fueron euploides. Dichos embriones euploides fueron transferidos en SET (*del inglés, "single embryo transfer"*).

Un análisis posterior demostró que solo 7 pacientes habían comenzado los ciclo de EOC post ASCOT en condiciones óptimas. Este grupo de pacientes recibió el nombre de "OPTIMUM". Son pacientes en donde se inició una EOC 15 días tras la técnica ASCOT, o bien tras evidenciar una elevación del AFC. Esto es así dado que, en análisis estadísticos posteriores a la finalización del seguimiento, se evidenció una elevación tanto del AFC como de los niveles de AMH alrededor del 15 día post ASCOT. En dicho grupo, se evidenció un aumento significativo en el AFC (8 folículos, $p = 0.0008$), el AFC en el ovario infundido (3 folículos, $p = 0.02$), y en el número de folículos puncionados (3 folículos, $p = 0.035$). Adicionalmente, la tasa de fertilización también mejoró tras ASCOT, de 68.6% a 74.5% ($p = 0.01$), de la misma forma que la tasa de cancelación se redujo al 0% (*tabla 7*).

| Parámetro | Previo a ASCOT (n=30) | Post-ASCOT (Todos, n=34) | Post-ASCOT optimum (n=7) | p-valor |
|--------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------|
| Edad paciente (años) | 36.0 [34.0-37.0] | 38.0 [36.0-38.0] | 34.0 [33.0-37.0] | <0.001 |
| Edad pareja (años) | 36.0 [35.0-40.0] | 37.0 [36.0-44.0] | 35.0 [34.0-38.0] | <0.001 |
| Años infertilidad | 3.0[2.0-4.0] | 4.0 [3.0-5.0] | 3.0[2.0-3.0] | <0.001 |
| Ciclos EOC (n) | 2 [1-2] | 2 [2-3] | 2[1-2] | NS |
| 1 | 7 | 5 | 1 | |
| 2 | 7 | 7 | 3 | |
| ≥3 | 1 | 3 | 0 | |
| IMC (Kg/m ²) | 24.0[23.0-25.0] | 24.0[21.0-25.0] | 24.0[18.0-25.0] | NS |
| FSH(IU/ml) | 10.1[9.3-14.5] | 12.3[9.7-21.5] | N.D. | NS |
| AMH (pM) | 1.0 [0.9-3.0] | 2.8 [0.7-3.7] | 2.9[2.3-4.1] | <0.001 |
| Días estimulación | 10.0 [9.0 - 12.0] | 9.0 [7.0 – 11.0] | 9.0 [9.0-12.0] | NS |
| Dosis de gonadotropina | 3937.0[2475.0-4950.0] | 4050.0[3150.0-4612.0] | 4100.0[4050.0-4950.0] | NS |
| E2 en día de HGC | 500.0[385.0-1296.0] | 585.0[386.0-775.0] | 661.0[253.0-1416.0] | NS |
| AFC total | 3[0-5] | 5[4-6] | 8[7-9] | 0.0008 |
| - Ovario control | 2[2-3] | 3[2-3] | 5[4-5] | NS |
| - Ovario infundido | 2[1-3] | 2[1-3] | 3[2-3] | 0.02 |
| Folículos puncionados | 3[1-6] | 3[1-4] | 3[2-4] | 0.035 |
| -Ovario control | 0[0-1] | 2[0-2] | 2[2-2] | NS |
| - Ovario infundido | 0[0-1] | 1[0-2] | 1[0-2] | NS |
| Ovocitos MII | 2[0-3] | 2[1-3] | 2 [1-4] | NS |
| - Ovario control | 0[0-1] | 1[0-1] | 1[1-2] | |
| - Ovario infundido | 0[0-0] | 1[0-2] | 01[0-1] | |
| Embriones | 1[0-2] | 1[1-2] | 1[0-4] | NS |
| - Ovario control | 0[0-0.5] | 0[0-1] | 0.5[0-2] | |
| - Ovario infundido | 0[0-0] | 1[0-1] | 0.5[0-1] | |
| Cancelación | 11/31(35.5%) | 6/34 (17.7%) | 0/7(0%) | <0.001 |

Tabla 7: Pacientes en estado basal, previo a FIV. Se muestran los datos de las pacientes en su estado basal, previo a realizar ciclos de FIV, tanto pre-

ASCOT, como post-ASCOT, como en el grupo "optimum". Los siguientes datos se expresan en mediana, entre paréntesis el IQR. N.D.=Dato no disponible.

Adicionalmente, se llevó a cabo un subanálisis, comparando el mejor ciclo previo a la técnica ASCOT, con el mejor ciclo tras la técnica ASCOT, de cada paciente, considerando el mejor ciclo aquel en el que se puncionaron un mayor número de folículos (*tabla 8*).

La dosis de gonadotropinas utilizada en este caso fue mayor tras ASCOT, en cambio, el número de días de estimulación fue similar en ambos casos. No obstante, ninguno de los dos resultados fue estadísticamente significativo. El valor de estradiol sérico el día de la administración de la hCG también fue mayor en los ciclos previo a ASCOT, sin significación estadística. El AFC fue significativamente mayor post ASCOT (2.9 vs 4.6, $p=0.036$), de la misma manera que también fue mayor en el ovario en el cual se infundieron las células por radiología intervencionista (1.1 vs 2.8, $p = 0.26$). Así mismo, el número de folículos con un tamaño superior a 16 mm previo a la punción también fue mayor tras ASCOT, sin evidenciarse diferencias estadísticas entre el ovario control y el ovario en donde se habían infundido las células (*tabla 8*).

Tras la punción, el número de folículos puncionados fue mayor tras ASCOT, pero sin diferencias significativas. Igualmente, el número de ovocitos MII obtenido también fue superior tras ASCOT, pero tampoco alcanzó la significancia estadística, y sin diferencias entre el ovario control y el ovario en donde se infundieron las células madre. El número de ciclos en donde no se obtuvieron ovocitos se redujo de 9 a 3 (*tabla 8*).

Por otro lado, el número de embriones por ciclo aumentó de 1.7 a 2.1 (NS). En dicho subanálisis, la tasa de cancelación previo ASCOT, fue del 38.8% (en 7 de las 18 pacientes), mientras que la tasa de cancelación post ASCOT fue tan solo del 6.6%, es decir en tres de la 18 pacientes. Pese a evidenciar una reducción en la tasa de cancelación, los resultados no fueron estadísticamente significativos (*tabla 8*).

| | Previos | Post-ASCOT | <i>p</i> -valor |
|--|-----------------|-------------------|-----------------|
| Dosis FSH (IU) | 3496.0 ± 1444.0 | 4280.0 ± 2108.0 | NS |
| Días de estimulación | 10.4 ± 2.7 | 10.5 ± 4.6 | NS |
| E2 día de administración de HCG | 1015.0 ± 736.5 | 634.0 ± 468.8 | NS |
| Folículos antrales. Total | 2.9 ± 1.9 | 4.6 ± 2.6 | 0.036 |
| - Ovario control | 2.5 ± 1.0 | 2.8 ± 1.5 | NS |
| - Ovario infundido | 1.1 ± 0.7 | 2.8 ± 1.4 | 0.026 |
| Folículos >16mm. Total | 2.4 ± 1.8 | 2.9 ± 1.2 | 0.05 |
| - Ovario control | 1.2 ± 1.0 | 1.5 ± 1.1 | NS |
| - Ovario infundido | 1.2 ± 1.5 | 1.5 ± 1.2 | NS |
| Folículos puncionados Total | 4.3 ± 3.1 | 4.7 ± 1.9 | NS |
| - Ovario control | 2.0 ± 2.1 | 1.9 ± 1.0 | NS |
| - Ovario infundido | 1.5 ± 1.8 | 2.1 ± 1.7 | NS |
| MII obtenidos. Total* | 2.3 ± 2.0 | 2.6 ± 1.6 | NS |
| <i>n de pacientes con MII:</i> | | | |
| 0 | 3 | 0 | |
| 1 | 2 | 7 | |
| 2 | 0 | 1 | |
| 3 | 4 | 3 | |
| ≥4 | 3 | 3 | |
| No obtención de ovocitos | 5 | 3 | |
| Ovocitos MII- Ovario control. | 0.5 ± 1.0 | 1.4 ± 1.0 | NS |
| Ovocitos MII -Ovario infundido | 0.3 ± 0.5 | 1.2 ± 1.0 | NS |
| Total de embriones por ciclo* | 1.7 ± 1.5 | 2.1 ± 1.6 | NS |
| <i>n de pacientes con embriones:</i> | | | |
| 0 | 9 | 4 | |
| 1 | 2 | 7 | |
| 2 | 4 | 2 | |
| ≥3 | 3 | 5 | |
| Embriones. Ovario control. | - | 1.0 ± 1.2 | |
| Embriones. Ovario infundido. | - | 1.1 ± 0.9 | |
| Ciclos cancelados (%) | 7/18 (38.8%) | 3/18 (6.6%) | NS |

Tabla 8: Resultados reproductivos tras ASCOT. Comparación entre el mejor ciclo pre-ASCOT vs. post ASCOT. Los datos se muestran como media±DE.

Finalmente, tras la transferencia embrionaria, se obtuvieron tres gestaciones clínicas, dos de ellas que terminaron en aborto. No obstante, en total fueron 6 las gestaciones obtenidas en el estudio, en 4 de las pacientes incluidas, pues tres de ellas se lograron de forma espontánea y sin ayuda de TRA. En total, nacieron 3 RNV, de las 18 pacientes a las cuales se les había realizado algún ciclo de EOC post ASCOT. Una de las pacientes tuvo un RNV, mientras una paciente tuvo dos RNV. En cambio, una tercera paciente, tuvo dos abortos en el primer trimestre de gestación, el primero en la semana 10 de gestación, y el segundo en la semana 8.

| POR | Edad | Ciclos | MII | MII OI | MII OD | Embriones (E) | Euploides | Gestación | Abortos | RNV |
|--------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|-----------|-----------|----------|----------|
| 1 | 38 | 4 | 3 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 38 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 38 | 3 | 6 | 2 | 4 | 4 | 1 | 1+1# | 1+1# | 0 |
| 5 | 39 | 2 | 3 | 3 | 0 | 2 | 0 | 1* | 0 | 1* |
| 6 | 40 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 39 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 37 | 3 | 6 | 2 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 35 | 2 | 8 | 3 | 5 | 6 | 1 | 1+1* | 0 | 1+1* |
| 10 | 38 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 34 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 33 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 38 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 33 | 1 | 5 | 2 | 3 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 37 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 36 | 3 | 5 | 4 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 37 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 35 | 1 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 37 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Total | | 34 | 57 | 29 | 28 | 38 | 7 | 6 | 3 | 3 |

Tabla 9: Resultados individuales post ASCOT, de pacientes que realizaron ciclos de FIV. Se muestran los resultados individuales de cada paciente, después de los tratamientos FIV realizados tras la técnica ASCOT. Los datos

se expresan en números absolutos. (*) =Gestación espontánea con RNV. (#) = gestación espontánea con aborto posterior.

4.1.7. Proteómica

Con el objetivo de identificar cambios en el contenido plasmático inducidos por la movilización e infusión de células madre, analizamos el plasma sanguíneo de las pacientes incluidas en esta rama del estudio. Se tomaron muestras de forma previa (PRE) a la movilización y aféresis de células madre, durante la aféresis, y 2 -3 meses tras la aféresis (POST). Estas muestras, fueron analizadas realizándose una cuantificación proteica mediante la técnica SWATH LC-MS/MS.

La concentración de las proteínas se calculó mediante el área bajo la curva de cada pico y se normalizó mediante la suma total de todas las áreas de las proteínas cuantificadas. Posteriormente se realizaron los tests de análisis de componentes principales y análisis discriminantes (PCA y DA), para reducir la dimensionalidad. Los perfiles proteómicos de los tres tipos de muestra analizados demostraron una clara separación entre las muestras de las proteínas previo a la aféresis, durante la aféresis, y post aféresis. (PC1:38.9%, PC2 16.8% and D1 50%, D2 50%).

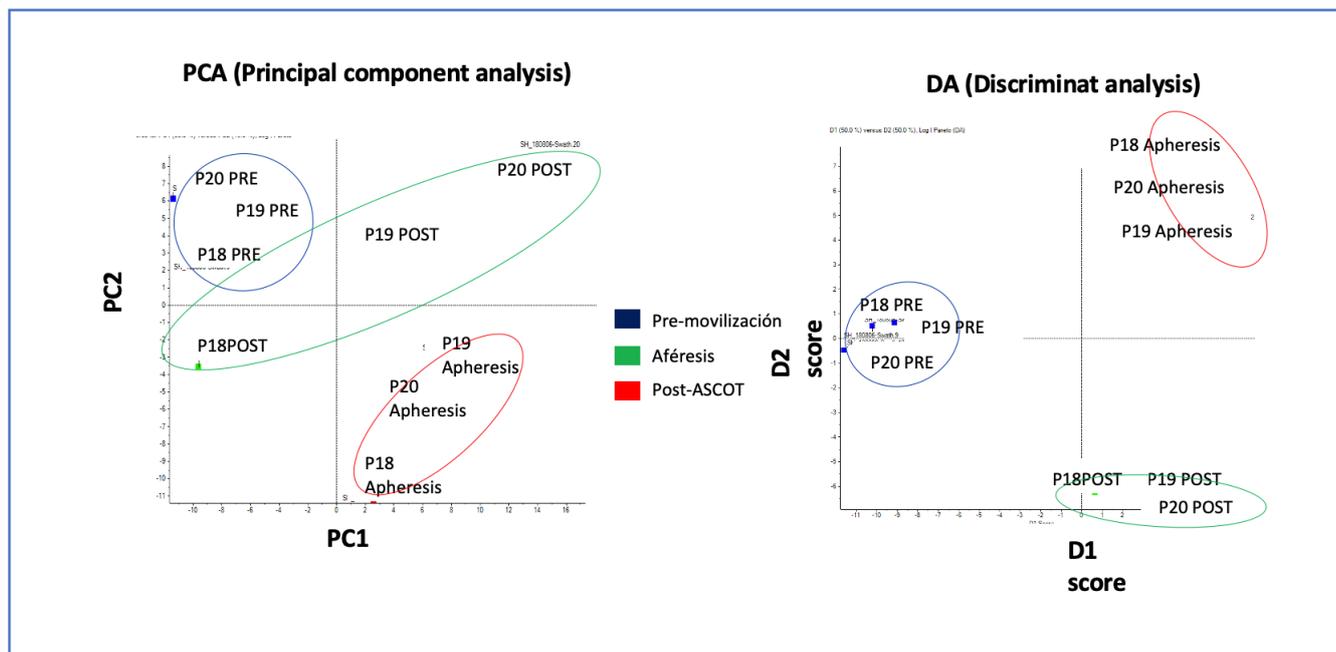


Figura 32: Análisis PCA y DA. En la figura se muestra el análisis PCA y DA, demostrando una clara separación entre las muestras de proteínas entre los tres grupos (PRE, AFÉRESIS, POST).

Con este análisis proteómico se identificaron un total de 296 proteínas, que componían el total de las muestras plasmáticas. Once de estas proteínas (3.7% del total de las proteínas; PPI enrichment p-value: $1.56e^{-06}$), se expresaban de forma diferencial durante la aféresis, al ser comparadas con las muestras previas. Tras ser analizadas 2 – 3 meses post aféresis, el número de proteínas que se expresaban diferencialmente había ascendido a 70 (23.6% del total de las proteínas; PPI enrichment p-value: $< 1.0e^{-16}$).

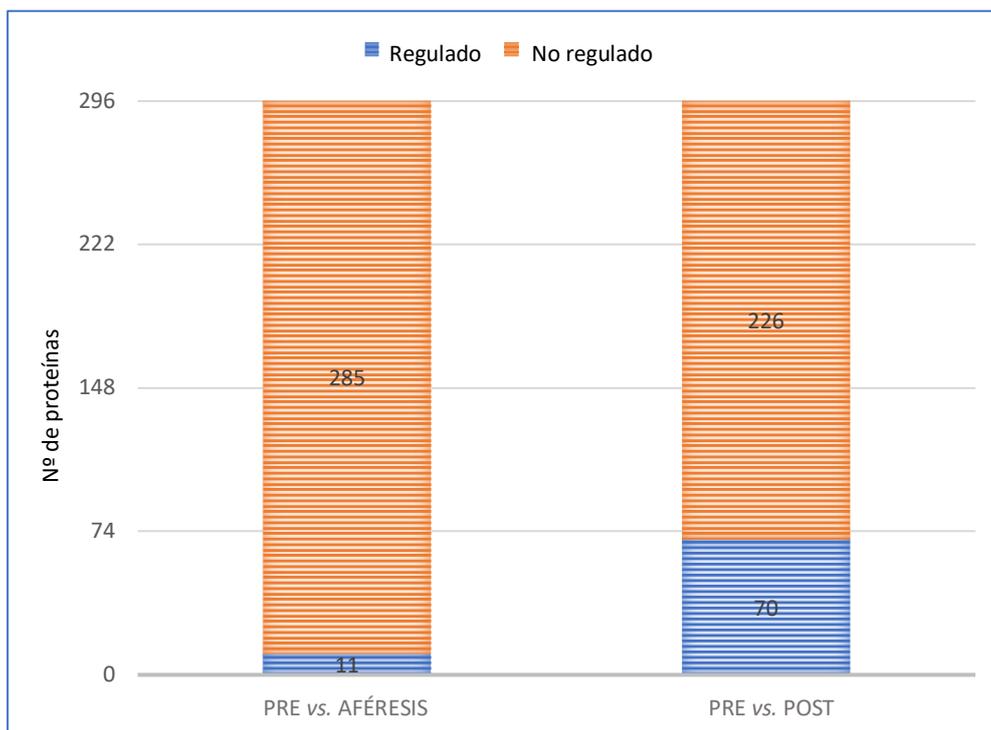


Figura 33: Análisis de las proteínas durante la aféresis (AFÉRESIS) y 3 meses tras ASCOT (POST). Se muestran las proteínas expresadas de forma diferencial: 11 proteínas durante AFÉRESIS, y 70 proteínas POST, de las 296 proteínas plasmáticas identificadas.

Ocho de las proteínas que se expresaban de forma diferencial, tanto en el primer como en el segundo análisis, resultaron ser comunes, todas ellas además presentaban funciones relacionadas con la vascularización, la regeneración celular, efecto anti- apoptosis, anti-inflamación y protección del nicho. De estas ocho proteínas, encontramos que el EPCR (*del inglés, “endotelial protein C receptor”*, o receptor endotelial de la proteína C), la THSP-1, el VCAM1 (*del inglés, “vascular cell adhesion molecule”*) y el Serpin-7 (THBG o *del inglés, thyroxine-binding globulin*), estaban aumentados tras ASCOT. Por otro lado, las proteínas APOC3 (Apolipoproteína C3), y la proteína VDBP (*del inglés, “vitamin D-binding protein”*, o proteína transportadora de la vitamina D), se vieron disminuidas.

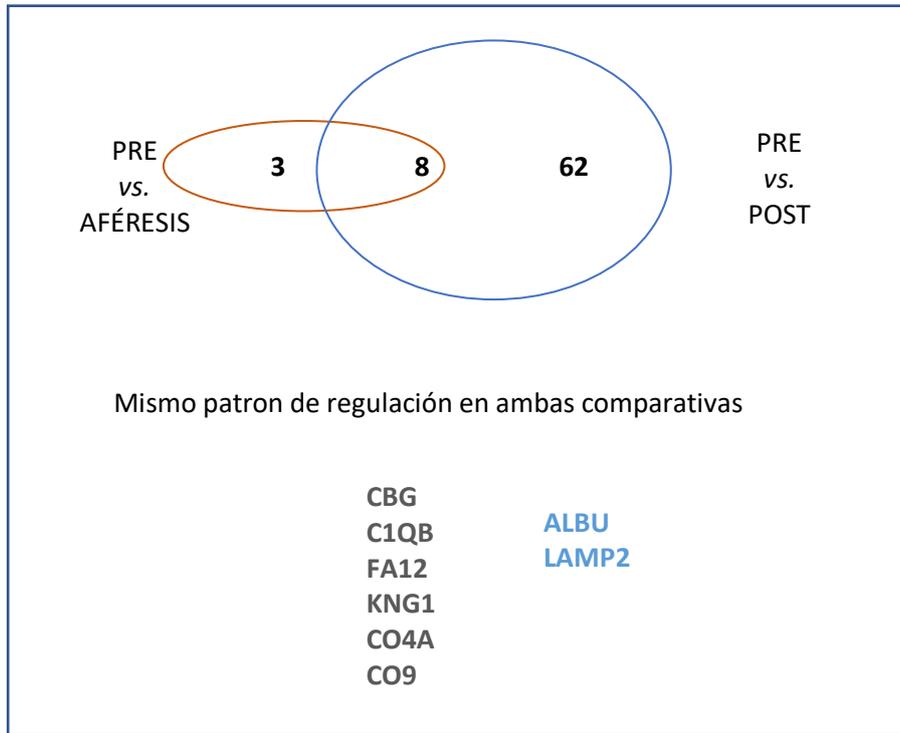


Figura 34: Análisis de expresión diferencial de proteínas. *En la figura se muestran las proteínas comunes que se expresaron de forma diferencial. En gris up-reguladas y en azul down-reguladas.*

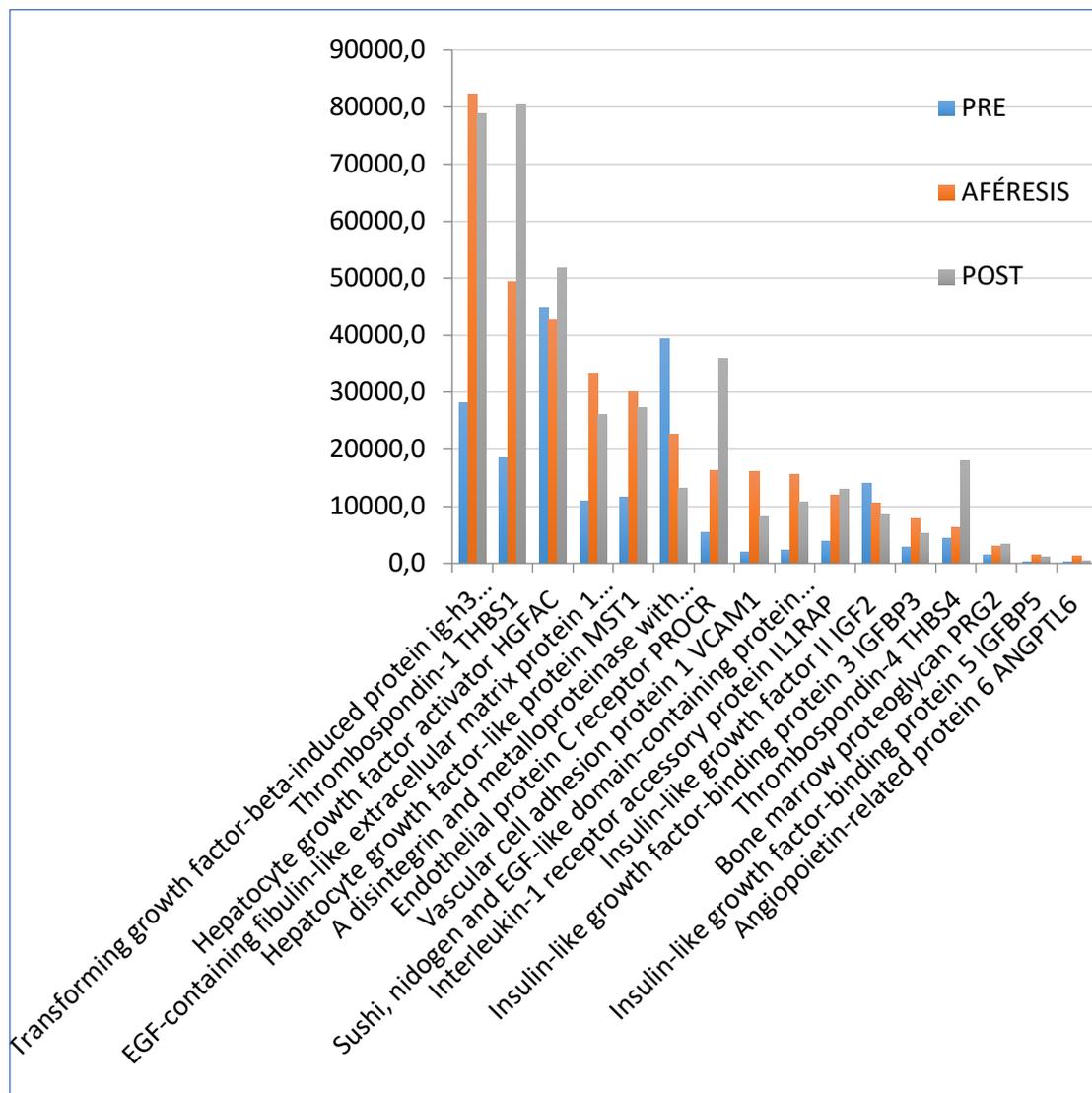


Figura 35: Proteínas expresadas de forma diferencial, PRE, AFÉRESIS, y POST ASCOT. *Análisis pormenorizado de la expresión de proteínas previamente relacionadas con la foliculogénesis vascularización y proliferación celular.*

Finalmente realizamos una comparativa para el perfil proteómico de cada una de las pacientes en los tres momentos analizados observándose un cambio general en el “heatmap” obtenido para los tres puntos temporales de análisis.

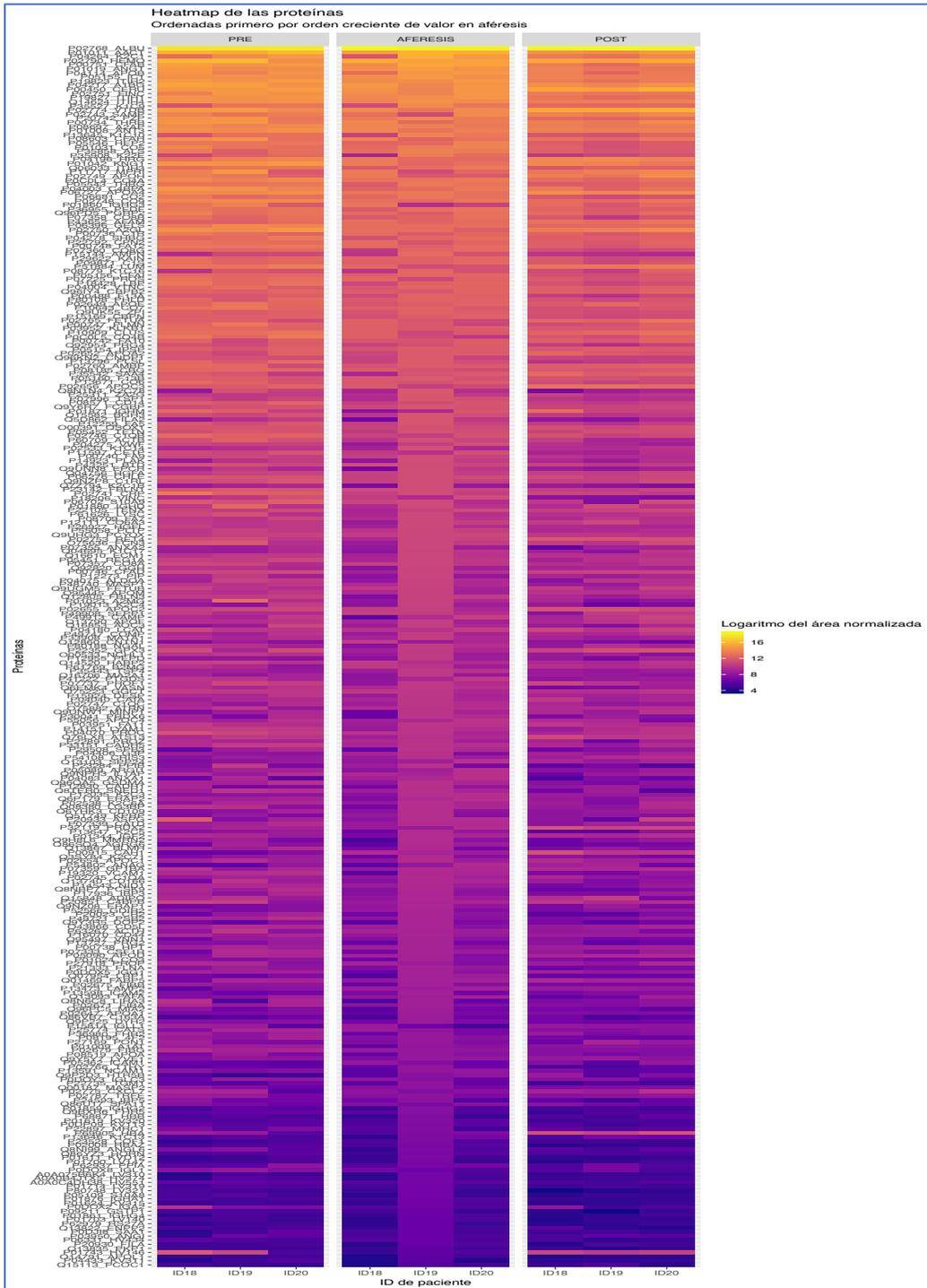


Figura 36: Heatmap individual. Comparativa para el perfil proteómico PRE, AFÉRESIS y POST.

4.2. ASCOT POI: ASCOT y MOVILIZACIÓN G-CSF.

4.2.1. Características de las pacientes.

A continuación, se presentarán los resultados preliminares obtenidos tras realizar un análisis interino, del segundo estudio realizado en pacientes POI, en donde hasta la fecha han finalizado el estudio 10 mujeres de las 20 a reclutar.

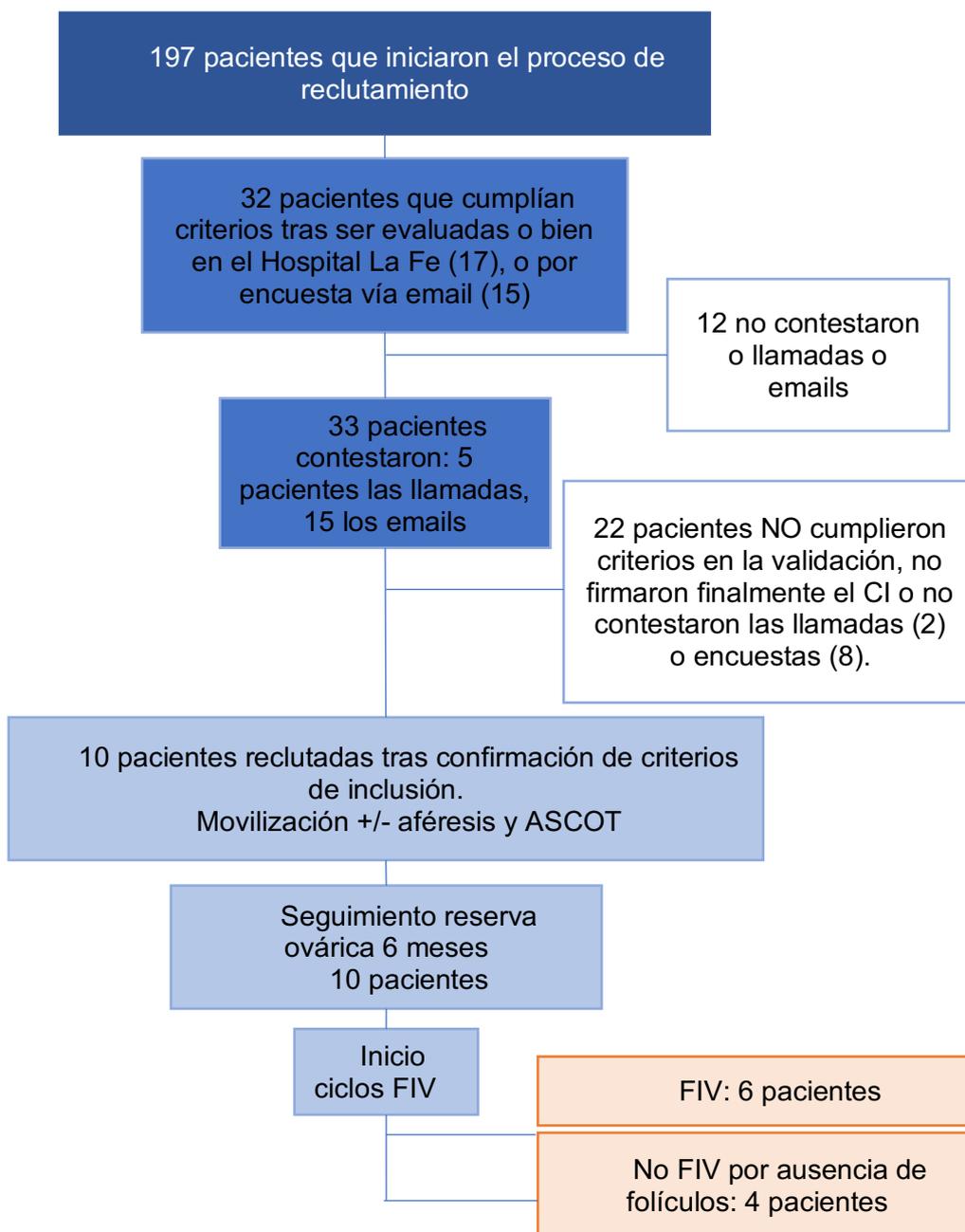


Figura 37: Proceso de reclutamiento de las pacientes POI en ASCOT-2. *En la figura se observa el flujo de trabajo, desde el inicio del reclutamiento, y el*

paso de las pacientes a través de las diferentes fases del estudio. Finalmente, hasta la fecha, son 10 pacientes las que son reclutadas, y 6 las que han iniciado ciclos de FIV.

El ensayo se encuentra actualmente detenido en este punto del reclutamiento a consecuencia a la pandemia mundial provocada por el virus SARS-CoV2 causante de la enfermedad COVID-19. El Ministerio de Sanidad Español ordenó a todos los grupos de Investigación que realizasen estudios de Investigación Clínica, que suspendiesen todas las visitas de monitorización previstas, así como el reclutamiento de nuevas pacientes. Por este motivo, en esta tesis doctoral, presento los datos preliminares, dado que la duración del estado de pandemia actual es incierto y la reanudación y finalización del ensayo clínico se alargará en el tiempo mucho más de lo previsto inicialmente.

Hasta la fecha, se ha reclutado un total de 10 pacientes, cuatro de ellas han sido aleatorizadas en el grupo de movilización celular con G-CSF, y seis pacientes en el grupo de ASCOT.

La edad de las 10 pacientes POI en el reclutamiento era de 33.7 años. La edad al diagnóstico de POI era de 30.8 ± 5.0 años, lo cual significa alrededor de 3.3 ± 4.16 años desde su diagnóstico. Cuando evaluamos las pacientes randomizadas a cada brazo, no se encontraron diferencias entre ellas para la edad de inclusión, ni la edad de diagnóstico de POI.

El diagnóstico de POI se estableció en 9 pacientes a partir de su sintomatología compatible con POI, como la oligomenorrea, y junto con la aparición de sintomatología vasomotora. Una de las pacientes presentó una evolución progresiva del diagnóstico de POR a POI durante la realización de ciclos de FIV.

Adicionalmente, la edad de la pareja era de 35.0 ± 2.3 años. Mientras que 7 mujeres podían hacer uso del semen pareja en el caso de ser preciso para un ciclo de FIV, ya que tenían un seminograma normal, 3 mujeres utilizaron semen de donante, dado que 2 pacientes no presentaban pareja y la pareja de una tercera mujer padecía el síndrome de Klinefelter.

Previo a la terapia con células madre, únicamente 4 pacientes habían realizado tratamientos de reproducción asistida: 3 IAs y 8 ciclos de FIV-ICSI en total. Una de las pacientes, procedente del grupo de movilización de células madre con G-CSF, un solo ciclo natural, sin obtener ovocito. Dentro de la rama ASCOT, una paciente había realizado en la Fe, un ciclo convencional de FIV, con altas dosis de FSH (375 UI diarias) y HMG (75 UI diarios), que fue cancelado por ovulación espontánea. Otra paciente, realizó 3 ciclos de FIV; en el primero se obtuvo un ovocito maduro, mientras que los dos ciclos siguientes fueron cancelados por ausencia de crecimiento folicular. La tercera paciente, realizó tres ciclos de IA sin éxito, y posteriormente 3 ciclos más de FIV: un primer ciclo en donde se extrajeron 2 ovocitos, en el cual solo uno fecundó, pero sin conseguir desarrollo embrionario; y un segundo y tercer ciclos que fueron cancelados por ausencia de crecimiento folicular.

Se midió la FSH durante el reclutamiento, y en la primera visita del estudio (FSH basal). El valor de la FSH recogida durante el reclutamiento, fue aportado por la paciente desde un laboratorio externo. En la primera visita, se determinó un nuevo valor de FSH, que se estableció como valor basal. Al comparar dichos valores, la FSH durante el reclutamiento resultó ser superior a la FSH basal en ambos grupos, sin demostrar tampoco diferencias significativas (*tabla 10*).

El recuento de folículos antrales basal al inicio del estudio era de 0.8 ± 0.5 folículos en total sin diferencias entre ambos ovarios (*tabla 10*). Tampoco se evidenciaron diferencias significativas en el AFC basal entre ambos brazos de estudio (*tabla 10*).

El valor de estradiol al inicio del estudio era de 78.1 ± 78.4 pM/L, en la rama ASCOT de 113.2 ± 85.1 , y en la rama de movilización de 25.5 ± 16.6 pM/L. La progesterona basal era mayor en la rama ASCOT, todo ello sin mostrar diferencias significativas.

Así mismo, la AMH inicial, tras el reclutamiento, era de 0.09 pM, y tampoco se encontraron diferencias entre la rama ASCOT y la rama movilización con G-CSF (tabla 10).

| Parámetro | POI (n=10) | ASCOT (n=6) | G-CSF movilización (n=4) |
|--|----------------------|----------------------|--------------------------|
| Edad paciente reclutamiento (años) | 33.8 [32.0-36.0] | 33.0 [32.0 – 35.5] | 33.0 [31.8 – 34.8] |
| Edad paciente primera visita (años) | 34.0 [32.3 – 35.8] | 34.0 [32.3 – 35.8] | 34.0 [32.5 -35.5] |
| Edad pareja | 34.0 [33.0 – 36.5] | 33.5 [33.0 – 34.0] | 37.0 [35.3 – 38.3] |
| Edad al diagnóstico de POI | 30.5 [30.0 – 34.3] | 31.5 [27.0 – 34.2] | 30.5 [30.0 – 34.8] |
| Años de infertilidad desde diagnóstico POI | 2.0 [1.0 – 15.0] | 2.0 [2.0 – 15.0] | 2.0 [1.0 – 3.0] |
| Ciclos FIV (n) | 2 [1 - 3] | 3 [2 - 3] | 1 [1 - 1] |
| 0 | 4 | 2 | 2 |
| 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2 | 2 | 1 | 1 |
| ≥3 | 3 | 2 | 1 |
| IMC (Kg/m ²) | 22.9 [21.3-24.1] | 22.5 [21.1-23.6] | 23.9 [23.1-24.0] |
| FSH reclutamiento (IU/ml) | 101.7 [63.7 – 116.6] | 90.5 [52.3 - 116.6] | 103.3 [74.3 – 121.8] |
| FSH basal (IU/ml) | 67.6 [38.7 – 86.0] | 41.7 [35.1 – 55.6.] | 88.2 [85.2 – 92.8] |
| AMH reclutamiento (pM) | 0.0 [0.0 - 0.1] | 0.1 [0.0 – 0.6] | 0.0 [0.0 – 0.1] |
| AMH basal (pM) | 0.1 [0.1 – 0.1] | 0.1 [0.1 – 0.1] | 0.1 [0.1 – 0.1] |
| AFC basal | 0 [0-1.5] | 0 [0 – 1.5] | 0 [0 - 3] |
| Estradiol basal pM/L | 34.0 [17.0 – 148.0] | 123.0 [16.8 – 189.5] | 20.5 [15.5 – 40.5] |
| Progesterona basal pM/L | 0.3 [0.2 – 0.4] | 0.3 [0.2 – 0.8] | 0.3 [0.2 -0.3] |

Tabla 10: Características basales de las pacientes POI. *En la tabla se muestran las características basales de las pacientes, previo al tratamiento con células madre. Los datos se expresan en mediana, y el IQR entre paréntesis.*

4.2.2. Técnica: Movilización celular a sangre periférica, aféresis e infusión celular.

La movilización celular a sangre periférica se llevó a cabo en ambos grupos del estudio, mientras que la aféresis e infusión celular, únicamente se realizó en el grupo ASCOT (descrito en “Material y Métodos”). En una de las pacientes del grupo ASCOT, no pudo realizarse la aféresis, dado que dicha paciente presentaba un alto riesgo de transmisión de priones, no obstante, si pudo realizarse el análisis celular, y esto no supuso problemas en el ensayo, dado que esta paciente pertenecía a la rama de “Movilización con G-CSF”.

No se evidenciaron diferencias entre las pacientes del grupo ASCOT y las pacientes pertenecientes al grupo de movilización celular, dado que el proceso inicial en ambas ramas del estudio (movilización con G-CSF), era idéntico en ambos grupos de pacientes.

Analizando al conjunto total de las pacientes POI, en todas ellas se alcanzó el límite deseado de células movilizadas a sangre periférica 4×10^6 CD34+ células por kg, el valor establecido para considerar que la movilización había sido efectiva.

La aféresis fue satisfactoria en las 6 pacientes de la rama ASCOT. En dicha rama del estudio, el volumen sanguíneo recolectado durante aféresis fue de 74.2 ± 17.3 ml. En este segundo estudio el volumen filtrado fue menor que en ASCOT-1, ya que tras el análisis de los datos iniciales se estableció que el volumen infundido era de alrededor de 35-40ml y se consideró por tanto que no era necesario recolectar un volumen mayor. El volumen infundido posterior en una de las arterias ováricas de las pacientes del brazo ASCOT, fue de 35.3 ± 14.6 mL.

| Variables de Aféresis | Media \pm DE | Mediana |
|---|--------------------|---------|
| IMC (Kg/m ²) | 22.7 \pm 1.7 | 22.9 |
| Volumen recolectado (mL) | 74.2 \pm 17.3 | 63.0 |
| Volumen infundido (mL) (brazo ASCOT) | 35.3 \pm 14.6 | 34.5 |
| Pre-aféresis CD34+/ μ L | 72.0 \pm 27.7 | 63.0 |
| Aféresis CD34+/ μ L | 1796.2 \pm 851.0 | 1815.0 |
| Aféresis células CD34+ (%) | 0.7 \pm 0.4 | 0.6.0 |
| Aféresis células CD133+ (%) | 0.6 \pm 0.4 | 0.5 |
| Células CD133+ infundidas (x10 ⁶) (Brazo ASCOT) | 50.0 \pm 0.0 | 50.0 |
| Factor de concentración de la aféresis | 28.2 \pm 5.6 | 28.7 |

Tabla 11: Resumen de los parámetros de movilización y aféresis en las pacientes POI. *Los datos se muestran como media \pm DE y mediana.*

En la rama movilización de células madre tras G-CSF, el análisis celular se realizó mediante una muestra sanguínea tomada de sangre periférica tras haber realizado la movilización celular (descrito en “Material y Métodos”). Así mismo, a estas pacientes se les realizó aféresis de un volumen pequeño de sangre, con el fin de tenerlo conservado para el futuro. De esta manera, si la rama de movilización con G-CSF, no hubiese sido efectiva, les habríamos propuesto el tratamiento ASCOT completo, fuera del estudio y de forma compasiva, sin necesidad de repetir el tratamiento de nuevo.

Con todo esto, en todas las pacientes POI, se estableció un total de 72.04 cel CD34/ μ L en sangre periférica, en el análisis que se realizó previo al procedimiento de aféresis en el día 5 de la movilización, y que determinó que el proceso se ha llevado a cabo con éxito y por tanto podía procederse a realizar la aféresis. En el análisis de citometría posterior a la aféresis, esto ascendió a 1796.2 cel/ μ L aféresis CD34, mientras que de CD133 se cuantificaron 1398.1 cels/ μ L. Al diferenciar estos datos entre ambas ramas del estudio (movilización con G-CSF y ASCOT), no se encontraron diferencias, existiendo un número

similar de células CD34 pre-aféresis (66.4 vs 74.8) y post aféresis (1513.2 vs 1984.9).

4.2.3 Composición celular del injerto

Dentro de la suma total de células madre derivadas de médula ósea movilizadas a sangre periférica, fue posible la diferenciación entre distintas subpoblaciones celulares, al igual que se realizó en el ensayo clínico con pacientes POR.

En ambas ramas del estudio, se analizó por medio de citometría de flujo, la composición celular total. Se determinó una cantidad de 1579.5 ± 933 células CD34+/ μL , tras la aféresis o tras la movilización celular en el caso de las pacientes del brazo de movilización. Sobre la celularidad total, $0.72 \pm 0.4\%$ células fueron CD34+, y $0.57 \pm 0.36\%$ células eran CD133+.

Centrándonos en las células CD133 + viables, $97.7\% \pm 4.4\%$ expresaron el marcador endotelial CD34+ (CD133+ CD34+). Un $2.0\% \pm 3.7\%$ eran CD133+ CD34 -. Por otro lado, el antígeno leucocitario común o CD45+, se expresó con distintas intensidades en las células CD133+. En un $90.1\% \pm 28.5\%$ del todas de células CD133+ se expresó con una baja señal, $9.9\% \pm 28.5\%$ lo expresaron de forma positiva (CD45++), mientras que el resto del componente celular CD133+ eran negativas para CD45 (0% del total)

En un análisis posterior, se trató de correlacionar los parámetros obtenidos por citometría con la respuesta al tratamiento (en cuanto a los biomarcadores de la reserva ovárica), al igual que se había efectuado con las pacientes POR en ASCOT-1. Sin embargo, no se obtuvo ningún resultado estadísticamente significativo. Los datos se muestran en la siguiente tabla:

| Población celular | AMH | | AFC | |
|-------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|
| | Respuesta positiva | No respuesta | Respuesta positiva | No respuesta |
| CD34+ | 0.6±0.2 | 0.8 ± 0.5 | 0.6 ± 0.3 | 0.8 ± 0.6 |
| CD133+ | 0.5 ± 0.1 | 0,6 ±0.4 | 0.5 ± 0.2 | 0.6 ± 0.6 |
| CD133+CD34+ | 99.6 ± 0.1 | 96.8 ± 5.3 | 97.3 ± 5.5 | 98.7 ± 0.8 |
| CD133+CD34- | 0.4 ± 0.1 | 2.8 ± 4.5 | 2.4 ± 4.7 | 1.3 ± 0,8 |
| CD133+CD45++ | 0.2 ± 0.2 | 14.1 ± 33.9 | 16.1 ± 36.7 | 0.6 ± 0.6 |
| CD133+CD45+ | 99.7 ± 0.2 | 85.9 ± 33.9 | 83.8 ± 36.7 | 99.3 ±0.6 |

Tabla 12: Composición celular del injerto tras el tratamiento con BMDSC según la respuesta ovárica de la paciente. Se muestran las poblaciones de BMDSC CD34+ y CD133+ como porcentaje respecto a la celularidad total de la aféresis. Por otro lado, las subpoblaciones de células CD133+ se muestran como porcentaje respecto al total de células CD133+ viables. *Los siguientes datos se expresan como media ± DE.*

4.2.4 Reserva ovárica

Para monitorizar la respuesta a la movilización periférica de células madre, o a la técnica ASCOT, se utilizó como marcador principal el AFC, contabilizados por ecografía transvaginal en cada consulta. Así mismo, se recogían los valores de FSH, estradiol, y AMH séricos, y se monitorizaba la evolución y la recuperación de menstruaciones junto con la función endocrina. Todos estos marcadores, fueron obtenidos previo al inicio del estudio, en condiciones basales, y recogidos de nuevo en cada visita del estudio tras haber realizado la técnica con células madre.

Los resultados preliminares de las primeras 10 pacientes reclutadas (análisis interino del estudio), mostraron un crecimiento folicular en ambos brazos del estudio, cuando fueron comparados con los valores basales. En concreto, fueron 7 pacientes en las que se evidenció un crecimiento folicular en algún momento del estudio: en la rama ASCOT, el AFC aumentó en un 83.3%

de las mujeres, esto es en 5 de las 6 pacientes reclutadas hasta la fecha, mientras que en el grupo de movilización fue en 2 pacientes de las 4 pacientes reclutadas (50%).

Además, en 5 de las 7 pacientes que mostraron crecimiento folicular, no fue de forma aislada, si no que se observó este crecimiento de forma repetida, en 3 puntos distintos del seguimiento (3 pertenecientes a la rama de movilización, y 2 de la rama ASCOT).

Así mismo, en 4 de las pacientes, se constató un crecimiento mayor a un folículo antral, respecto al AFC basal (1 paciente del grupo de movilización y 3 pacientes ASCOT). Por otro lado, en 6 pacientes se evidenció el aumento en AFC más allá del día 30 post tratamiento (2 del grupo movilización y 4 del grupo ASCOT), lo cual sugiere un mecanismo de reclutamiento folicular distinto al de las pacientes POR, y además descarta que los folículos reclutados estuviesen presentes previo a la intervención con BMDSC.

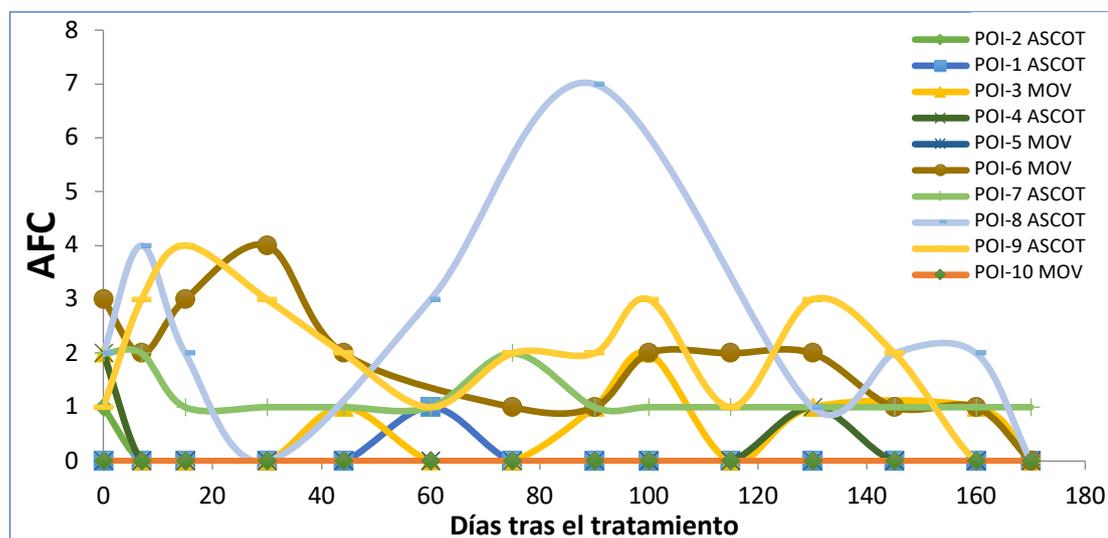


Figura 38: Progresión individual de recuento de folículos antrales (AFC) en pacientes POI. En esta figura se muestra la progresión individual de cada paciente en el AFC a lo largo del seguimiento del estudio.

En el caso de las pacientes POI, los criterios de éxito se consideraban: una elevación en el AFC (igual o superior a 1 folículo), o un ascenso en los

niveles de AMH séricos (aumento en 2 DE, sobre los niveles basales). Teniendo en cuenta estos criterios, 6 de las 10 pacientes (60%) (2 del brazo de movilización y 4 del brazo ASCOT) tuvieron una respuesta positiva tras el tratamiento con BMDSC.

Adicionalmente, en los niveles séricos de AMH se evidenció un incremento de 0.35 pM (2DE) en 3 de las 10 pacientes reclutadas. Una de ellas pertenecía al grupo de movilización y las otras dos al grupo ASCOT. Sin embargo, estas variaciones en los valores séricos de AMH no fueron significativas.

En total, las pacientes que cumplieron ambos criterios de mejora de reserva ovárica (AFC y AMH), fueron 3 pacientes (30%), una correspondía al grupo de movilización con G-CSF y la otra al grupo ASCOT.

En cuanto al descenso de FSH, no se ha evidenciado una disminución significativa hasta la fecha. Sin embargo, es importante destacar que la FSH descendió más de dos medidas consecutivas en 1DE (30 UI de FSH) en 6 de las 10 mujeres POI reclutadas actualmente. Así mismo, 2 mujeres en el grupo de movilización con G-CSF (50%), y una mujer del grupo ASCOT (16%), mostraron un descenso a la mitad en los niveles hormonales al final del periodo de seguimiento (106 a 36.6; 65.6 a 11.8; y 34.9 a 18.1 UI/mL; respectivamente).

El estradiol sérico en el reclutamiento era de 78,1 en las POI, curiosamente era mayor en las pacientes aleatorizadas en la rama ASCOT que en movilización (113,2±85,1 vs. 25,5±14,6). En las pacientes ASCOT se observó una elevación del mismo en los días 60 y 145 de seguimiento mientras que en las de movilización estos picos se localizaron los días 45 y 90. De la misma manera, debido al bajo tamaño muestral tampoco se advirtieron diferencias significativas a lo largo del seguimiento respecto al basal en cada una de las pacientes, salvo elevaciones puntuales en el momento del crecimiento folicular.

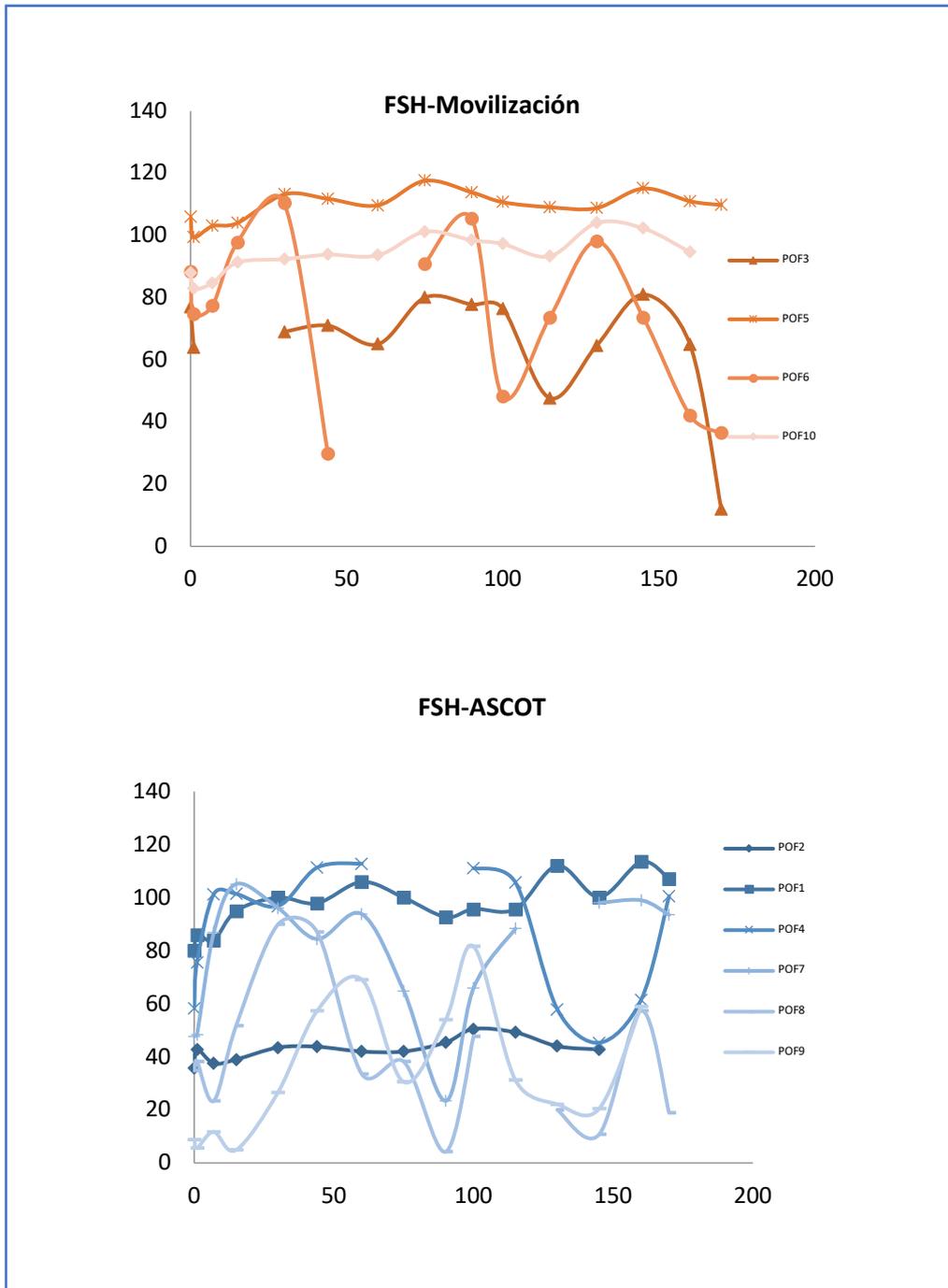


Figura 39: variaciones individuales de FSH en ambas ramas del estudio.
 En esta figura se muestran las variaciones individuales de cada paciente en los niveles de FSH a lo largo del seguimiento, en cada rama del estudio.

| Tiempo tras ASCOT | AFC TOTAL | AMH (pmol/l) | FSH (UI/mL) |
|--------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Nivel Basal | 1.3 ± 1.1 (1.5) | 0.2 ± 0.2 (0.1) | 62.5 ± 30.4 (67.6) |
| D+1 | 0 ± 0 (0) | 0.2 ± 0.2 (0.1) | 61.7 ± 3 (69.3) |
| D+7 | 1.1 ± 1.5 (0) | 0.3 ± 0.5 (0.1) | 67.8 ± 34.2 (84.0) |
| D+15 | 1 ± 1.5 (0) | 0.6 ± 0.2 (0.1) | 76.7 ± 35.9 (95.0) |
| D+30 | 0.8 ± 1.5 (0) | 0.1 ± 0.0 (0.1) | 83.8 ± 28.6 (94.3) |
| D+44 | 0.6 ± 0.9 (0) | 0.1 ± 0.0 (0.1) | 78.8 ± 27.9 (85.7) |
| D+60 | 0.6 ± 0.9 (0) | 0.1 ± 0.1 (0.1) | 80.6 ± 29.5 (93.6) |
| D+75 | 0.6 ± 0.9 (0) | 0.2 ± 0.2 (0.1) | 73.9 ± 31.5 (80.0) |
| D+90 | 1.3 ± 2.2 (1) | 0.2 ± 0.5 (0.1) | 68.4 ± 38.6 (77.8) |
| D+100 | 1.8 ± 3.1 (0.5) | 0.2 ± 0.3 (0.1) | 78.5 ± 24.8 (79.0) |
| D+115 | 0.4 ± 0.7 (0) | 0.1 ± 0.0 (0.1) | 77.1 ± 28.1 (88.3) |
| D+130 | 0.9 ± 1.1 (1) | 0.1 ± 0.1 (0.1) | 70.1 ± 36.8 (64.5) |
| D+145 | 0.6 ± 0.9 (0) | 0.1 ± 0.1 (0.1) | 68.9 ± 36.8 (77.3) |
| D+160 | 0.5 ± 0.7 (0) | 0.1 ± 0.0 (0.1) | 78.1 ± 26.4 (64.8) |
| D+170 | 0.1 ± 0.3 (0) | 0.1 ± 0.1 (0.7) | 68.3 ± 43.9 (93.5) |

Tabla 13: Seguimiento del AFC, AMH, y FSH tras el tratamiento con BMDSC, en ambas ramas del estudio. *Se muestra la evolución de los parámetros de AFC, AMH y FSH a lo largo del seguimiento. Los datos se presentan en media + DE (mediana).*

4.2.5 Síntomas vasomotores y recuperación de menstruación

Durante las visitas clínicas, se recogió información sobre la sintomatología de la paciente, en concreto sobre la sintomatología vasomotora y la recuperación de la menstruación. Todas las pacientes presentaban oligo/amenorrea de más de 4 meses y describieron la presencia de sofocos previo al tratamiento.

Durante el seguimiento, un 50% de las pacientes reportaron en alguna de las visitas una mejoría de los sofocos: 4 pacientes de la rama ASCOT (66.6%), y una paciente de la rama movilización (33.3%). Es más, 4 de estas pacientes que percibieron una mejoría, lo hicieron más de un mes tras el tratamiento con células madre.

Así mismo, un 30% percibió una mejoría de la sequedad vaginal, 2 mujeres de la rama ASCOT (33.3%) y una mujer de la rama movilización (33.3%). Todos estos síntomas eran consecuencia del déficit estrogénico, y por tanto mejoraron con las variaciones hormonales que se produjeron durante el seguimiento de las pacientes.

Por otro lado, un 40% (4 de las 10 pacientes) relataron una recuperación de la menstruación en algún punto del seguimiento del estudio, 2 mujeres pertenecientes al grupo ASCOT (2/6, o 33.3%), y otras 2 del grupo movilización con G-CSF (2/4, o 50%). Tres de estas menstruaciones fueron espontáneas, sin coincidir con ningún ciclo de FIV ni toma de tratamiento hormonal. Dentro de estas menstruaciones espontáneas, dos pacientes presentaron la menstruación durante los primeros meses de seguimiento (1 del grupo movilización y otra del grupo ASCOT), mientras que la tercera tuvo la menstruación tras 3 meses del tratamiento (rama movilización).

Tras finalizar el seguimiento, se mantuvo el contacto con las pacientes. Dos de las diez pacientes incluidas en el estudio presentaron menstruaciones regulares tras finalizar el seguimiento, (una de ellas de la rama de movilización y la otra de la rama ASCOT). Una tercera paciente, del brazo de estudio movilización con G-CSF, no presentó menstruaciones, pero sí que percibió tensión mamaria relacionada con variaciones cíclicas hormonales.

4.2.6 Factores de crecimiento solubles liberados tras ASCOT

En el caso de las pacientes POI, únicamente se determinó la concentración de los factores de crecimiento FGF-2 y THSP-1 en el día de la aféresis (ver tabla 14), ya que fueron los que mostraron una correlación positiva con la respuesta de los biomarcadores de reserva ovárica en el estudio anterior con pacientes POR. Curiosamente, parece que en el conjunto de pacientes POI, los niveles globales de ambos factores son mayores que en las POR, especialmente en el caso de la THSP1. Existe además una tendencia a mayor concentración de FGF-2 y THSP1 en las pacientes del brazo de movilización, lo que deberá ser reevaluado en el futuro cuando existan más muestras disponibles.

| Parámetro | <u>POI (n=10)</u> | <u>Movilización (n=4)</u> | <u>ASCOT (n=6)</u> | <u>p-valor</u> |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| FGF-2 (pg/mL) | 30.9 ± 9.2; 30.3 [27.2-35.7] | 37.6±7.5; 38.4 [32.0-43.2] | 26.4±7.6; 28.4 [18.9-32.2] | 0.06 |
| THSP-1 (ng/mL) | 3437.7±1737.2; 3617.0 [2017.0-5104.0] | 3587.1±1930.6; 3980.0 [2023.0-5252.0] | 3338.1±1779.3; 3316.0 [2217.0-4441.0] | 0.76 |

Tabla 14: Concentración plasmática de los factores solubles en pacientes POI, que presentaron una respuesta positiva tras el tratamiento con BMDSC. Se muestra la concentración plasmática de los factores solubles FGF-2 y THSP-1, dado que en el estudio ASCOT-1 fueron aquellos que mostraron una correlación positiva con los biomarcadores de reserva ovárica. En el caso de las pacientes POI, dichos niveles plasmáticos de los factores solubles fueron mayores que en el caso de las pacientes POR. Los datos se presentan en media + DE; mediana e IQR.

A pesar de que no se obtuvieron correlaciones significativas con la respuesta ovárica positiva establecida como aumento de RFA y/o AMH, debido al bajo número de muestras disponibles (n=4 movilización y n=6 ASCOT), si parece existir una tendencia a mayores niveles de FGF-2 en aquellas pacientes

que experimentaron una mejora de los parámetros de reserva ovárica (35.4 ± 8.8 vs. 28.9 ± 9.3 pg/ml) , aunque no es estadísticamente significativa.

4.2.7 Resultados FIV y reproductivos.

En total, como se ha mencionado previamente, previo al ensayo clínico, únicamente 4 pacientes habían realizado TRA, lo que supone un total de 11 ciclos. De estos 11 ciclos, 3 de ellos fueron IAS, mientras que 8 fueron FIV. Dicha proporción de COS era tan baja, debido a que las pacientes con POI no presentan folículos antrales en los ovarios, susceptibles a ser estimulados durante una TRA. No obstante, tras ambas técnicas con células madre, se realizaron un total de 16 ciclos, en 6 de las pacientes que iniciaron el estudio.

De la rama ASCOT una paciente, realizó un ciclo de FIV en el hospital La Fe, con altas dosis de FSH y HMG, o “ciclo convencional de FIV”, que tras punción de un único folículo en crecimiento resultó ser un ovocito no maduro. Una segunda paciente realizó 3 ciclos de FIV, y una segunda paciente realizó 3 IAs, sin éxito, y 3 ciclos más de FIV: el primer ciclo se obtuvieron 2 MII que no fecundaron, y los dos ciclos posteriores fueron cancelados. Otra paciente realizó así mismo 3 ciclos de FIV, en uno de ellos tras punción se obtuvo un ovocito no maduro, y los otros dos también fueron cancelados.

Tras ASCOT, 4 de las 6 pacientes de esta rama del estudio realizaron ciclos de FIV (66.6%). El número de ciclos totales realizados en esta rama del estudio fue de 10 ciclos. En 5 de los ciclos realizados, se escogió una estimulación ovárica con “protocolo japonés”. En otro ciclo también se optó por un “protocolo mild”. Fueron 3 ciclos los que se realizaron en “ciclo natural”. Por último, en una de las pacientes en un ciclo se prefirió un “ciclo convencional”.

| Paciente | Movilización/ ASCOT | Ciclos PRE tratamiento | | Ciclos POST tratamiento | |
|-----------------------|------------------------|---------------------------|-----|----------------------------|-----|
| | | IAS | FIV | IAS | FIV |
| POI 1 | ASCOT | 0 | 0 | 0 | 0 |
| POI 2 | ASCOT | 0 | 0 | 0 | 0 |
| POI 3 | Movilización | 0 | 1 | 0 | 2 |
| POI 4 | ASCOT | 0 | 1 | 0 | 1 |
| POI 5 | Movilización | 0 | 0 | 0 | 0 |
| POI 6 | Movilización | 0 | 0 | 0 | 4 |
| POI 7 | ASCOT | 0 | 3 | 0 | 2 |
| POI 8 | ASCOT | 0 | 0 | 0 | 4 |
| POI 9 | ASCOT | 3 | 3 | 0 | 3 |
| POI 10 | Movilización | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ciclos totales | Ambos grupos | 3 | 8 | 0 | 16 |

Tabla 15: Ciclos de IA y FIV pre y post tratamiento con BMDSC.

Comparación entre los ciclos IA y FIV previo al tratamiento con BMDSC y post tratamiento, individualizado por cada paciente.

En el grupo de movilización con G-CSF, una de las pacientes realizó previo a la intervención un ciclo de FIV en “ciclo natural”, obteniendo un folículo vacío tras la punción. En cambio, tras la terapia con células madre, 2 de las 4 pacientes reclutadas en esta rama del estudio (50%), realizaron ciclos de FIV, realizándose un total de 6 ciclos.

Tras la movilización celular con G-CSF, se empleó así mismo, el “protocolo japonés” en 3 de los ciclos iniciados, mientras que en otro ciclo se prefirió un “protocolo mild”.

Al analizar el momento en el que se iniciaron los ciclos tras el tratamiento con BMDSC, se evidenció que únicamente 5 de los ciclos se iniciaron durante

los 3 primeros meses de seguimiento (18.7%). En cambio, los otros 11 ciclos se realizaron durante los últimos 3 meses de seguimiento (68.7%), incluso 7 de ellos en los últimos 2 meses (43.7%).



Figura 40: Etapa del seguimiento en el que se iniciaron los ciclos de FIV.

Más de dos tercios de los ciclos se iniciaron durante los últimos 3 meses, mientras que el resto se realizaron durante los primeros tres meses.

Se compararon los resultados de FIV tras la técnica con células madre, con los ciclos de FIV realizados previo al tratamiento. Sin embargo, al tratarse de pocos los ciclos realizados previo al tratamiento, y dado que la mayoría se realizaron fuera de nuestro centro, solo disponíamos de los mismos el protocolo empleado y el resultado reproductivo de los mismos.

El valor de estradiol obtenido el día del triggering con HCG en todas las pacientes del estudio que realizaron ciclos de EOC tras tratamiento con BMDSC, fue de 190.7 ± 212.6 pmol/mL. Al analizar el valor de estradiol en el grupo ASCOT y en el grupo de movilización con G-CSF, no se encontraron diferencias.

En cuanto al AFC, el AFC el día de inicio de la EOC era de 1.6 ± 0.8 folículos, sin diferencias entre el ovario infundido y el ovario control (en el caso

de las pacientes de la rama ASCOT). El día de la inducción de la ovulación, el número de folículos mayores de 16 mm y susceptibles de ser puncionados era de 0.7 en ambos grupos, sin hallar diferencias entre los dos grupos.

De las 4 pacientes en las que se había realizado ciclos de FIV previo a la técnica con células madre, se había realizado punción folicular en un 37.5% de las pacientes, obteniendo ovocitos en MII en 12.5% de los ciclos (en uno de los 8 ciclos iniciados, se obtuvieron 2 MII). No obstante, no se obtuvo embrión en ninguna de las pacientes, y por tanto la tasa de gestación fue del 0%, dado que no fue posible la transferencia embrionaria. La tasa de cancelación de estos ciclos de FIV fue del 62.5%, es decir, de 5 de los 8 COS iniciados.

Por otro lado, en las 6 pacientes a las que se les realizó ciclo de FIV tras la técnica con células madre, se llegó a ejecutar la punción folicular en un 68.7% de los ciclos iniciados (11 de 16 COS). La tasa de cancelación fue del 31.2%, es otras palabras, en 5 de los 16 ciclos iniciados.

Hasta la fecha, se han obtenido 4 ovocitos en MII, lo cual son 25% de los ciclos, y 2 embriones (12.5% de los ciclos). De los ovocitos MII obtenidos, 75 % fueron del grupo ASCOT (3 ovocitos, 2 de ellos de la misma paciente), y 25% del grupo de movilización con G-CSF (1 ovocito). De los embriones, uno de los embriones se logró en la rama ASCOT, y el otro en la rama movilización con G-CSF.

Se transfirieron ambos embriones, en cada una de las pacientes, en “ciclo sustituido”, esto es, administrándose estradiol en la primera mitad del ciclo y estradiol y progesterona en la segunda mitad del ciclo. Tras la transferencia embrionaria, se alcanzó la gestación en una de las pacientes, perteneciente a la rama ASCOT, que actualmente se encuentra en la semana 30 de gestación y se trata de una gestación de curso normal.

| Parámetro | PREVIO (n=8) | POST, todas(n=16) | POST ASCOT (n=10) | POST G-CSF (n=6) |
|------------------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|------------------------|
| Edad de la paciente | N.D. | 34.0 [31.0 - 37.0] | 34.0 [32.0- 37.0] | 34.0 [31.0- 37.0] |
| Años desde el diagnóstico de POI | N.D. | 2.0 [1.0-15.0] | 2.0 [2.0- 15.0] | 2.0[1.0-3.0] |
| Ciclos EOC (n) | 2 [1-3] | 1.5 [0 - 4] | 1.5 [0 - 4] | 1 [0 - 4] |
| 0 | 6 | 4 | 2 | 2 |
| 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 2 | 0 | 2 | 1 | 1 |
| ≥3 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| FSH(IU/ml) | N.D. | 35.7 [4.9- 64.9] | 32.3[4.9- 64.9] | 41.5[11.8- 73.6] |
| AMH (pM) | N.D. | 0.1 [0.1-1.8] | 0.2[0.1 -1.8] | 0.1[0.1-0.3] |
| Días de estimulación | N.D. | 8.5 [1.0- 16.0] | 8.0[1.0-15.0] | 15.0[5.0- 16.0] |
| E2 el día de administración de HCG | N.D. | 102.5 [4.0 - 709.0] | 136.5[4.0 - 709.0] | 91.0 [31.0- 339.0] |
| AFC total | | 1 [1-3] | 1[1-3] | 2[1-3] |
| -Ovario control | N.D. | | 1[0-2] | |
| -Ovario infundido | | | 1[0-1] | |
| Folículos puncionados | | 1[0-2] | 1[0-2] | 1[0-1] |
| -Ovario control | N.D. | | 1[1 -2] | |
| -Ovario infundido | | | 0[0-1] | |
| Ovocitos MII | | 0 [0-1] | 0 [0-1] | 0 [0-1] |
| -Ovario control | N.D. | | 0.5 [0-1] | |
| -Ovario infundido | | | 0 [0-1] | |
| Embriones | | 0 [0-1] | 0[0-1] | 0[0-1] |
| Cancelación | 5/8 (62.5%) | 5/16(31.2%) | 3/10 (30%) | 2/6(33 .3%) |

Tabla 16: Resultados FIV de pacientes POI incluidas en el estudio. Se muestran los datos de las pacientes tras realizar ciclos de FIV, previo y post tratamiento con BMDSC. Los siguientes datos se expresan en mediana, entre paréntesis el IQR. N.D=Dato no disponible.

4.2.8. Proteómica

Para reducir la dimensionalidad y evaluar los resultados del análisis proteómico, se realizó un análisis exploratorio multidimensional, concretamente un DA.

En un primer análisis centrado en ver las diferencias entre los dos brazos del estudio (Movilización y ASCOT), observamos una clara separación entre las muestras (*Figura 1*). Concretamente, las muestras de ambos brazos se separaron principalmente a lo largo del eje discriminante 2 (D2), el cual explicó el 16.7% de la variabilidad de los datos.

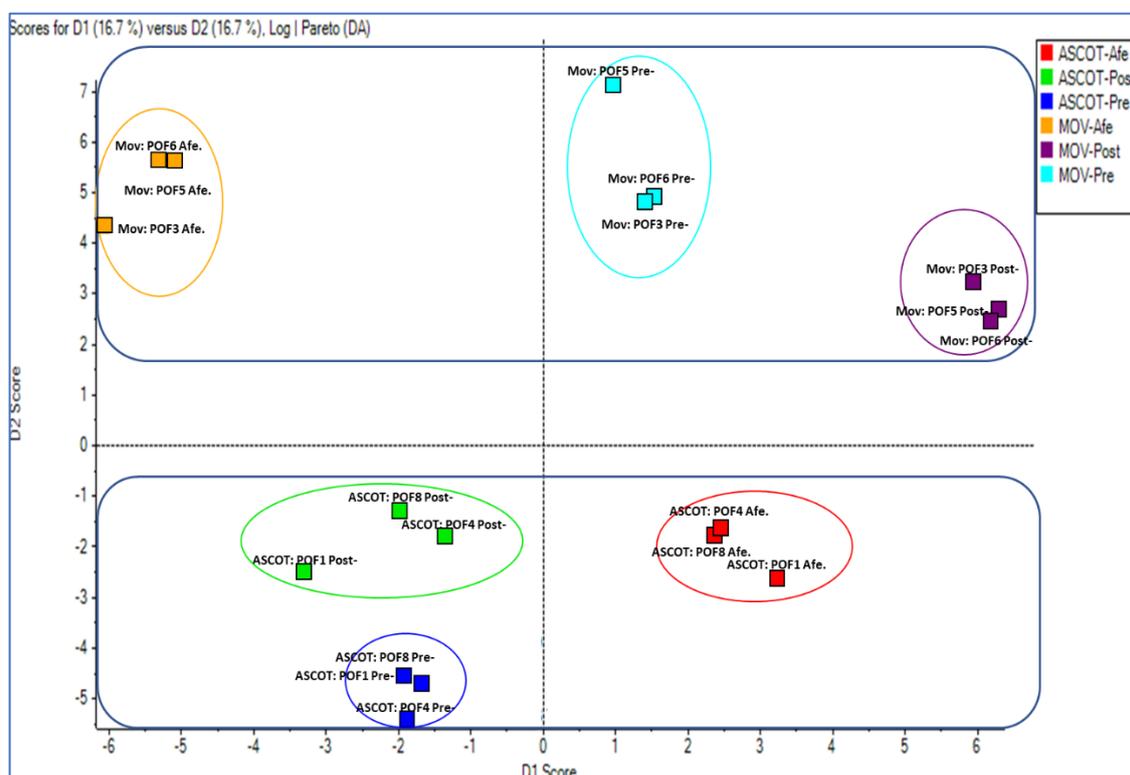


Figura 41: Análisis Discriminante (DA). El análisis de reducción de la dimensionalidad mostró una clara separación entre las muestras tanto en función del grupo de estudio (Mov. y ASCOT) como en función del momento de la recogida de la muestra de plasma (PRE-, AFÉRESIS, POSTt-).

Dentro del brazo Movilización, las muestras se agruparon a nivel proteómico en función del momento de su recogida (PRE-, AFERESIS y POST), observándose una clara separación de éstas en el eje discriminante 1 (D1: 16.7%). Este resultado sugiere que la simple movilización de las células madre a sangre periférica, es suficiente para producir cambios proteómicos sistémicos que se mantienen en el tiempo (hasta 3 meses después de la movilización).

En el brazo ASCOT, la D2 separó las muestras PRE- y POST-, mientras que la D1 separó las muestras de aféresis de las dos anteriores. Estos resultados sugieren que la técnica ASCOT produce cambios a largo plazo en el perfil proteómico del plasma sanguíneo, siendo dichos cambios distintos a los que produce la simple movilización de las células madre.

En un segundo análisis para ver el efecto específico de la reinfusión de las células madre en el ovario consideramos todas las muestras Pre- y todas las muestras de aféresis como un mismo grupo independientemente del brazo del estudio al que pertenecían. Como se puede observar en la Figura 2, en este análisis se detectó una clara separación entre las muestras POST- de las pacientes a las que solo se les realizó la movilización y las muestras Post- de las pacientes en las que tras la movilización se realizó la infusión en ovario. Concretamente, las muestras POST- de las pacientes del brazo ASCOT se solaparon con las muestras de aféresis, indicando este resultado que 2.5 meses después de la reinfusión de las células madre en ovario el plasma sanguíneo presenta un perfil proteico similar al de las muestras de aféresis. No ocurrió lo mismo, en el caso de las muestras POST- de las pacientes del brazo de Movilización, que no mostraron solapamiento alguno con las muestras de aféresis.

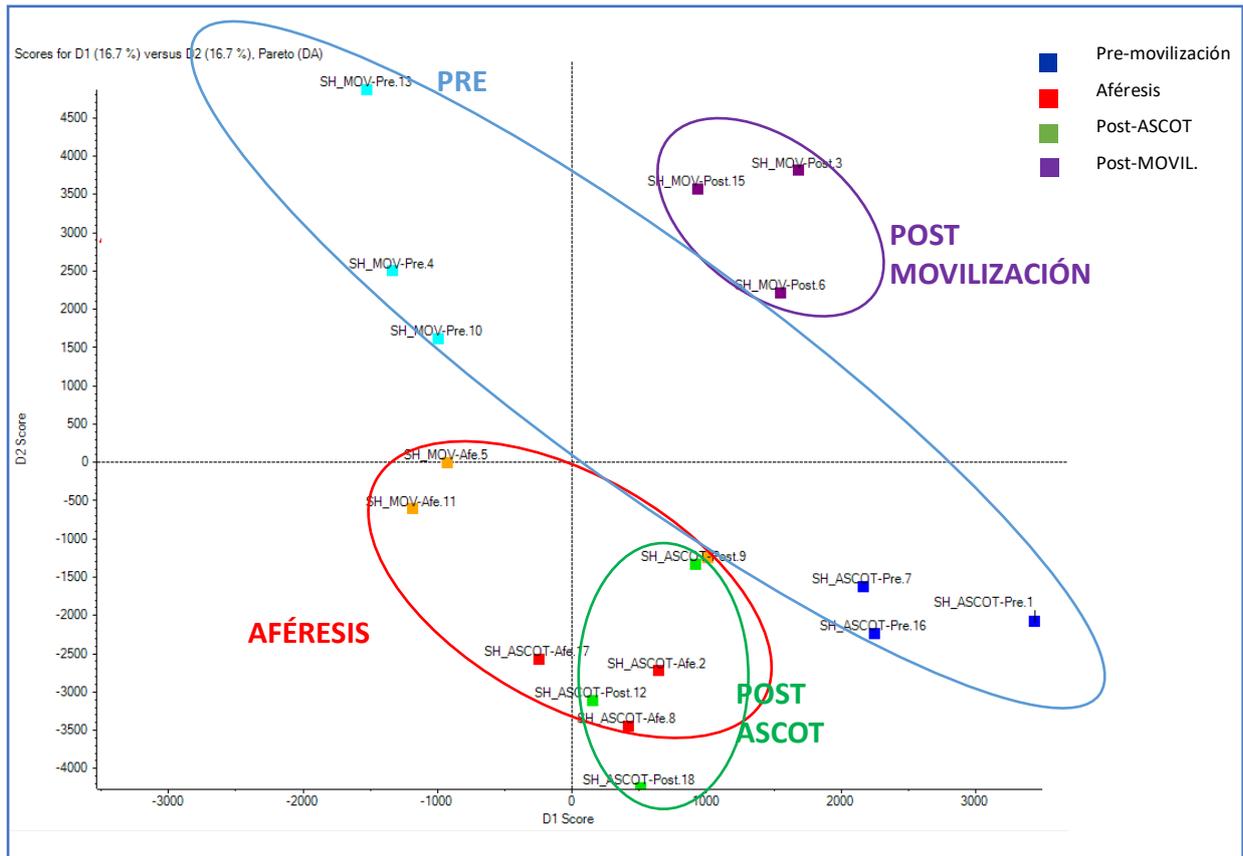


Figura 42: Análisis discriminante. Se observa una clara separación entre las muestras POST- de ambos brazos del estudio, siendo las Post- del grupo ASCOT bastante similares a las muestras de aféresis.

El análisis proteómico identificó un total de 431 proteínas en las muestras de plasma analizadas. En el grupo Movilización, 17 proteínas (3.9%) se expresaron diferencialmente entre AFÉRESIS. vs. PRE-, mientras que 6 (1.4%) lo hicieron entre las POST- vs. PRE-. En el grupo ASCOT, 18 proteínas (4.2%) se expresaron diferencialmente entre AFÉRESIS vs. PRE- y 12 (2.8%) en la comparativa POST- vs. PRE-.



5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Este trabajo constituye la agrupación de dos ensayos clínicos piloto para esclarecer definitivamente el efecto positivo de las células madre de médula ósea en pacientes con baja o nula reserva ovárica. Es decir, se trata de una “prueba de concepto” en humanos de los estudios experimentales previos realizados y publicados en modelos animales (1). La enseñanza general es que se trata de una terapia nueva, desarrollada desde el inicio e íntegramente por nosotros, que puede ser una alternativa más eficaz que las existentes para POR, y desde luego una terapia innovadora en las mujeres con POI (este último ensayo todavía continúa el proceso de reclutamiento). Empleando este manejo terapéutico, se obtuvieron 6 gestaciones en el primer estudio piloto con POR, 3 de estas gestaciones logradas de forma espontánea, y 1 gestación en el segundo estudio con POI, la primera descrita hasta la fecha en este grupo de pacientes tras infusión de BMDSC. Hasta la fecha, han nacido 3 RNV en el primer estudio piloto, estando el embarazo del segundo estudio piloto de 30 semanas de gestación.

Conseguir gestaciones a término es el objetivo primordial de estos ensayos clínicos, sin embargo, este trabajo debe entenderse como un planteamiento científico en busca de respuestas al uso de BMDSC para despertar los ovarios y movilizar la producción de folículos. Nuestros objetivos fueron siempre, por un lado, conseguir el rescate folicular en ovarios, cuyo funcionamiento era más lento o inexistente, y por otro lado, con las enseñanzas de estos estudios en animales y en humanos pretendemos finalmente identificar las posibles proteínas responsables de todos los efectos positivos encontrados, para en definitiva aplicar tratamientos menos invasivos y más eficientes a las mujeres que los pudieran necesitar. La base de la Discusión de esta tesis doctoral, son los hallazgos científicos que consideramos de interés para continuar progresando.

5.1. El estudio ASCOT-1 (pacientes POR)

En el primer estudio piloto, con pacientes POR (ASCOT-1), se evidenció una mejoría de la función ovárica en 74% de las pacientes, considerando los biomarcadores de reserva ovárica (AFC y AMH). Ambos marcadores alcanzaron su valor máximo alrededor de las 4 semanas post ASCOT, siendo el incremento del AFC estadísticamente significativo en el día 15 post tratamiento. Tras ello, se evidenció una segunda oleada, unos 3 meses tras ASCOT (entre el día 43 y 92). De la misma forma, en los valores de AMH se observó un ascenso alrededor del día 15 post ASCOT, pese a que este no fue estadísticamente significativo, y una segunda oleada posterior a los 80 – 130 días del seguimiento.

Esta primera elevación en el AFC y valores séricos de AMH, se correspondería con el rescate de los folículos secundarios o preantrales tempranos presentes en el ovario. Gracias a la regeneración del nicho ovárico por las BMDSC, dichos folículos pueden ser rescatados. En condiciones normales, las pacientes POR presentan estos folículos secundarios, sin embargo dada su alteración ovárica van a sufrir una atresia antes de llegar al estadio antral, de ahí la ausencia o reducción característica del AFC en las pacientes POR (116). Este rescate puede deberse en gran medida a la regeneración del nicho ovárico promovida por las BMDSC, que ha sido previamente descrita tanto en tejido murino como humano por nuestro grupo (1,117). El aumento de la vascularización local ovárica, la mejora de la proliferación y la reducción de la apoptosis, principal mecanismo de atresia folicular, inducen un cambio en el microambiente o nicho ovárico que lo hace capaz de mantener el rápido crecimiento y proliferación de las células foliculares, especialmente la granulosa. Así pues, estos folículos que de otra forma morirían, son rescatados y llegan al estadio antral, explicando el notable aumento del AFC detectado a las dos semanas de la infusión celular. La secreción de AMH por parte de las numerosas capas de células de la granulosa que los componen, sería la responsable del aumento detectado en los niveles séricos de AMH.

Tras este primer efecto, se evidenció una segunda oleada de crecimiento folicular, caracterizada por un ascenso en el AFC y AMH, al final del seguimiento de las pacientes. Este crecimiento folicular se puede correlacionar con el

reclutamiento de los folículos primordiales que se encuentran de forma quiescente en el ovario y que tardan alrededor de 3 a 6 meses desde que son activados hasta alcanzar el estadio antral, cuando son detectados ecográficamente(14). Esta teoría se desarrollará más adelante en la discusión.

Esta respuesta positiva tras ASCOT permitió una EOC en 18 de las 19 pacientes reclutadas que completaron la fase de seguimiento de la reserva ovárica. Tras ello, se logró disminuir la tasa de cancelación de los ciclos, uno de los principales problemas en estas pacientes, incrementar la tasa de folículos puncionados y MII obtenidos por FIV, aumentar la tasa de fecundación a embriones, y así mismo la tasa de gestación tras FIV. Pero la EOC se realizó cuando fue conveniente para la paciente y para el equipo médico, pues el objetivo primario era la observación de los marcadores de reserva folicular con el tiempo.

Hoy podemos decir que tras ASCOT en POR las condiciones óptimas para realizar un ciclo de FIV son alrededor del día 15 tras ASCOT, tal y como se evidencia del aumento del AFC observado en este momento tras el análisis de datos al concluir el estudio. De hecho, los ciclos que se habían realizado en estas condiciones óptimas recibieron el nombre de "OPTIMUM". Por ello, tras realizar este análisis, y con los ciclos realizados posterior a dicho análisis que se habían seguido en condiciones óptimas, el AFC fue superior y la tasa de cancelación fue inferior a la previa, demostrado diferencias significativas, pese a que ya se había observado una mejoría de dichos parámetros en el análisis global de ciclos que incluía aquellos iniciados en condiciones no óptimas.

¿Cómo se explica este efecto positivo en algunas mujeres y qué hemos encontrado diferente en aquellas que respondieron respecto a las que no lo hicieron?

5.1.1. BMDSC: composición celular y factores solubles liberados por las BMDSC con acción paracrina

En el ensayo ASCOT- 1, teniendo en cuenta que las BMDSC son una población heterogénea de células madre que comprende progenitores hematopoyéticos, mesenquimales y endoteliales, tratamos de correlacionar las distintas poblaciones celulares con la mejoría de la reserva ovárica y resultados reproductivos tras FIV en pacientes POR. Por ello, durante la aféresis, analizamos la composición celular mediante citometría de flujo, empleando distintos marcadores de linaje hematopoyético.

Tras la movilización con G-CSF, se evidenció un aumento en la presencia de BMDSC circulantes, detectándose en todas las pacientes más de 10,000 células CD34+/mL. Sin embargo, no se constató una relación entre la composición celular y la optimización de la reserva ovárica, y tampoco se pudieron emplear para predecir la optimización de la reserva ovárica. No obstante, en estudios previos, si que se ha relacionado una inducción de efectos regenerativos tras administración de G-CSF en algunos tejidos reproductivos, en otros estudios, tanto en animales como en humanos, y por tanto el efecto de la composición celular sobre la reserva ovárica debe ser estudiada con más detenimiento (118,119).

El uso de células madre, gracias a capacidad de liberación de factores solubles de forma paracrina, va a favorecer la regeneración del microambiente o nicho ovárico y por tanto el crecimiento de los folículos primordiales, que se encuentran de forma quiescente en el ovario. Sin embargo, las investigaciones con la médula ósea empezaron hace casi 20 años y tuvieron en sus inicios una orientación muy diferente.

En 2004 se publicó, tras estudios en animales, que los ovarios de ratones adultos eran repoblados diariamente con ovocitos primordiales, mediante la presencia de células madre germinales presentes en los ovarios (120), cuestionando uno de los principales dogmas de la medicina reproductiva. Más adelante, el mismo grupo estudió el trasplante de células madre de procedentes de médula ósea, en ratones hembra tratados previamente con quimioterapia,

para conseguir la depleción folicular. Dos meses tras el tratamiento, observaron ovocitos inmaduros y folículos en los ovarios de estos animales, que se mantuvieron hasta 11 meses tras el tratamiento. Tras identificar este hallazgo, realizaron la hipótesis de que las células madre eran las responsables de realizar una repoblación directa de los ovocitos (95).

Ninguna de estas teorías ha sido apoyada por otros investigadores. Es más, un año después, el grupo de Eggan desmontó esta teoría, afirmando la no evidencia de que las células madre procedentes de médula ósea, ni ningún tipo de célula circulante, contribuye a la formación directa de ovocitos (96). Incluso muy recientemente se ha apostado más evidencia de que estos supuestos eran totalmente erróneos(100).

Así mismo, otros estudios que han empleado células madre han tratado de demostrar como las distintas poblaciones celulares y la liberación de factores paracrinos de las células madre favorece el desarrollo folicular, dejando atrás la teoría de la repoblación ovocitaria directamente desde células madre. De hecho, la señalización paracrina es uno de los principales mecanismos de actuación de las células madre adultas, entre las que se encuentran las BMDSC (82).

El grupo de Veitia (94) publicó un caso de recuperación de la fertilidad con gestación espontánea, en una mujer con menopausia como consecuencia de un tratamiento quimioterápico. Esta recuperación de la fertilidad se achacó al trasplante alogénico hematopoyético HLA compatible que recibió durante el tratamiento de su enfermedad. En consecuencia, analizaron el ADN del RNV, el de la madre (la enferma), y el de la donante de MO, constatando una relación genética entre la madre y el RNV, mientras que entre el RNV y la donante, no existía ninguna relación genética. Con esto, surge la teoría de que las células madre no repueblan directamente los ovocitos, si no que, a través de la regeneración del nicho ovárico, favorecen el crecimiento de los mismos.

Adicionalmente, el grupo de Xiao, tras demostrar un retorno de la fertilidad en ratones con el trasplante de células madre procedentes de líquido amniótico, llegaron a la hipótesis de que los ovocitos generados por la foliculogénesis estimulada y la descendencia, no eran derivados directamente de las células

madre trasplantadas, ya que las células madre de líquido amniótico trasplantadas eran previamente marcadas con un marcador fluorescente (EGFP), y la descendencia no presentaba dichos marcadores (105).

Como consecuencia, dado que la hipótesis es que el nicho ovárico se regenera gracias a la liberación de factores paracrinos de las células madre, tratamos de relacionar la liberación de dichos factores paracrinos con la respuesta positiva observada tras la terapia con BMDSC.

Como ya se ha mencionado previamente en esta tesis doctoral, los mismos factores solubles que se han descrito en células madre se han relacionado así mismo con la foliculogénesis (82). Existen diversos factores de crecimiento que van a jugar un papel muy importante en la regulación del reclutamiento folicular (además de las gonadotropinas). Los factores solubles son liberados de forma paracrina y autocrina por el ovario, como las prostaglandinas, hormonas esteroides, factores de crecimiento. Dichos factores, dependiendo de como se expresen y de su mecanismo de acción, van a favorecer la foliculogénesis, o, por el contrario, van a inhibir el crecimiento folicular (23).

En el estudio ASCOT-1 con POR, en aquellas pacientes en donde se evidenció una elevación de AMH y AFC, se reportó así mismo un aumento en la concentración plasmática (detectada en aféresis) del FGF-2. El FGF- 2 se ha relacionado con el crecimiento folicular, siendo responsable de la estimulación del desarrollo durante la foliculogénesis y la selección del folículo dominante posterior (121). Tanto el factor de crecimiento como su receptor se expresan tempranamente en los folículos humanos, y desempeñan una función importante en la síntesis de estrógeno. Cuando este factor se encuentra sobreexpresado, se ha constatado una mejora de la foliculogénesis y un restablecimiento de la neoangiogénesis (91). Por otro lado, se ha propuesto también como responsable de la regeneración celular y reparación de tejidos, tras la inyección de plasma enriquecido con factores de crecimiento en organismos envejecidos(90).

Además, en pacientes con una respuesta positiva de AMH tras ASCOT, se detectó así mismo una elevación en los niveles de THSP-1 analizados en aféresis. También se evidenció una correlación positiva con el incremento de

AFC. El factor THSP-1, es un regulador clave de la angiogénesis (122,123), proceso que ya se ha identificado como clave en el funcionamiento del mecanismo de rescate en nuestros estudios previos. Esto es de vital importancia ya que se ha demostrado mediante el empleo de ultrasonido tridimensional *power-Doppler* que el flujo sanguíneo ovárico es menor en mujeres añosas y con POR que en normorespondedoras. La red vascular juega además un papel clave en la formación de la cavidad antral y en la formación del cuerpo lúteo en animales sanos. THSP-1 se ha relacionado también con la foliculogénesis, siendo un mediador importante de la angiogénesis y de la foliculogénesis ovárica (124). Su sobreexpresión se ha asociado con efectos regenerativos, tras la terapia celular con células CD133 en patología endometrial (125,126).

Por tanto, tras la movilización de BMDSC se generó un aumento de la liberación paracrina de FGF -2 y THSP-1, correlacionada de forma significativa con el incremento en el AFC. Ambos factores ya se habían relacionado previamente con el desarrollo de la foliculogénesis, por consiguiente, el aumento en la concentración de estos dos factores puede suponer una explicación del porque se genera una respuesta positiva tras ASCOT.

En cambio, otros factores paracrinos como el PDGF-BB y el IGF-1, que también se han visto relacionados con la foliculogénesis, no mostraron una correlación positiva con las variaciones de AFC y AMH. El IGF-1 y IGF-2, también juegan un papel importante en la regulación del desarrollo ovocitario. Ambos se han encontrado en las células de la teca de los folículos antrales, mientras que el IGF-1 se ha aislado en las células de la granulosa de los folículos dominantes (127).

El PDGF-BB, también desempeña un a función crucial en la foliculogénesis, ya que su inhibición favorece la apoptosis y atresia folicular (128).

Otros factores también relacionados con la foliculogénesis, y en donde no se ha visto una correlación positiva con la variación de la reserva ovárica tras ASCOT, son los miembros de la superfamilia TGF- β y el EGF. Algunos miembros de la superfamilia TGF- β , van a actuar de forma paracrina o autocrina en la

regulación del desarrollo folicular y maduración ovocitaria (estos miembros son: la activina, la inhibina, follistatina, TGF- β , la AMH, etc.), El EGF juega un papel importante en la ovulación y controla la maduración ovocitaria (129). El factor endotelial VEGF, es un factor que favorece la angiogénesis, y se ha observado un aumento de su concentración en el líquido folicular tras el pico de LH previo a la ovulación.

5.1.2. Proteómica

En un intento por obtener una visión global de los efectos inducidos por ASCOT, tratamos de relacionar el contenido del proteoma plasmático, y los cambios producidos en estas proteínas tras el tratamiento, con la respuesta positiva evidenciada en nuestros ensayos clínicos.

En el primer ensayo clínico con POR, tras realizar el análisis proteómico, se identificaron 296 proteínas, componiendo el total de las muestras plasmáticas. De estas, 11 se expresaban de forma diferencial durante la aféresis (AFÉRESIS), al ser comparadas con las muestras pre-aféresis. Tras ASCOT (POST), estas proteínas ascendían a 70. Al comparar todas estas proteínas que se expresaban de forma diferencial, se evidenció que 8 proteínas coincidían entre el grupo AFÉRESIS y POST.

De estas ocho proteínas específicas, encontramos que el EPCR, la THSP-1, el VCAM1 y Serpin-7 (THBG), estaban aumentados tras ASCOT, llamando la atención el hecho de que el descenso de VCAM1 y THBG se había relacionado previamente con el envejecimiento. De hecho, EPCR tiene entre sus múltiples funciones la de ejercer un efecto citoprotector que incluye efectos antiapoptóticos, antiinflamatorios y de estabilización de membranas (130). La THSP-1, además de ser un regulador clave de la angiogénesis, ya había demostrado en nuestro estudio una correlación positiva con el aumento observado del AFC y AMH tras el tratamiento (117), lo que confirma el papel clave de la vascularización ovárica y la regeneración del nicho tras ASCOT.

Por otro lado, las proteínas APOC3, y la proteína VDBP, se vieron disminuidas. Dichas proteínas previamente habían sido descritas como incrementadas con el envejecimiento.

En cuanto a sus funciones, la THBG es uno de los diversos receptores para la hormona tiroidea. El VCAM-1, es una proteína mediadora de la adhesión de leucocitos al endometrio vascular (131). El EPCR, receptor de las células endoteliales, es una proteína transmembrana que juega un rol muy importante en la vía anticoagulante de la proteína C; al promover la activación de dicha proteína, se va a inactivar la activación de los factores de la coagulación FVIIIa y FVa y con ello disminuye la formación de trombina (130). La APOC3 se encarga de inhibir la enzima lipasa, y se sospecha que inhibe la captación hepática de las partículas ricas en triglicéridos. La VDBP, es una proteína que se une a la vitamina D y sus metabolitos plasmáticos, y los transporta a los tejidos (132).

5.1.3. Aneuploidías

Tras el estudio con pacientes POR (ASCOT-1), se evidenció una tasa de aneuploidía elevada (7 de 38 embriones obtenidos fueron euploides, es decir, 81.6% fueron aneuploides). Este hallazgo se confirmó durante un análisis interino que se realizó mientras el ensaño clínico seguía su curso. Dicho efecto se asumió como consecuencia de la edad, dado que la calidad ovocitaria disminuye de forma exponencial a partir de los 38 años, y a partir de los 40 años, la tasa de aneuploidía ovocitaria es del 80% (133). De hecho, tras realizar dicho análisis, identificamos que el 30-35% de las pacientes reclutadas eran mayores de 38 años, y que la gran mayoría eran mayores de 35 (solo 4 pacientes eran menores de 35 años).

En consecuencia, en ese momento, se decidió cambiar el criterio de edad, a “menores de 38 de edad” en el primer ensayo clínico, y de la misma manera, en el segundo ensayo clínico con pacientes POI (ASCOT-2), se estableció desde el inicio el criterio de edad también en “menores de 38 años”.

Con este descubrimiento, nos dimos cuenta de que, aunque las BMDSC tienen un efecto positivo sobre la reserva ovárica, no modifican la calidad ovocitaria, y por eso la tasa de euploidía se veía afectada, sobretodo en el caso de las pacientes POR, en donde la edad puede estar aumentada (es uno de los criterios diagnósticos, según los criterios de Bolonia y los criterios de Poseidon)(33,35).

5.1.4. Variabilidad inter-pacientes

Pese haber seguido los criterios de Bolonia durante el reclutamiento, existe mucha variabilidad entre las pacientes POR, (33,134). Esto puede conllevar a que muchos de los efectos generados por ASCOT, sean enmascarados, y no sean detectados, o las diferencias no sean significativas. Como se ha analizado previamente en “Resultados”, pese a que el aumento en los marcadores de reserva ovárica es claro, muchos de los resultados no fueron estadísticamente significativos. Esto va a ser principalmente por la dificultad en el diagnóstico de las pacientes con POR, dado que es un cajón de sastre en donde hay mucha heterogeneidad. Según los criterios de Bolonia (33), las pacientes pueden considerarse como POR, si cumplen uno de los tres criterios (edad materna avanzada, episodio de baja respuesta tras EOC, o una baja reserva ovárica según el AFC o AMH). En cambio, tras dos episodios de baja respuesta tras EOC (obtención de 3 o menos ovocitos), ya se puede considerar a una paciente como POR, pese a que no cumpla los otros dos criterios, y en consecuencia, podemos tener pacientes consideradas como POR, con marcadores de reserva ovárica que no estén muy alterados, y viceversa.

Para solventar este problema, se establecieron los criterios del grupo Poseidon (35), que trató de realizar una clasificación más homogénea y con mayor relevancia clínica. Según esta última clasificación, nuestras pacientes corresponderían al grupo 3 y 4: Pacientes menores de 35 años con baja reserva (AFC menor de 5 y AMH < 1.2 ng/mL), y pacientes mayores de 35 años con baja reserva.

A pesar de ello, sigue habiendo mucha variabilidad entre nuestras pacientes POR, dado que la edad juega un papel muy importante en la calidad ovocitaria, y esto no está contemplado en la clasificación de Poseidon (35).

Por todo esto, tras finalizar el primer ensayo clínico con pacientes POR, se comenzó el segundo ensayo clínico en pacientes POI, puesto que se sugiere que estas últimas pacientes tienen mucha menos variabilidad, y los resultados serían más homogéneos.

5.2. El estudio ASCOT-2 (pacientes POI)

Tras los resultados prometedores en ASCOT-1, se realizó un segundo estudio con pacientes POI (ASCOT-2). En este estudio, se dividió a las pacientes en dos ramas. En la rama ASCOT, de la misma manera que el estudio anterior, se inyectó el mismo número de células, sin tener en cuenta la tasa de movilización. En la segunda rama, únicamente se realizó movilización celular, para investigar si únicamente con el tratamiento de G-CSF se observaba el mismo efecto en la reserva ovárica. Esta nueva rama del estudio nació tras evidenciar en el primer estudio ASCOT-1 como el crecimiento folicular (y el resto de parámetros) mejoraban en ambos ovarios, pese a que las células se depositaban únicamente en una de las dos arterias ováricas. Por ello, la hipótesis fue que, aunque las células se depositasen en un solo ovario, ambos ovarios se iban a beneficiar del efecto positivo de las células madre, debido a la liberación de factores solubles a sangre periférica. Además, ya en nuestros estudios animales previos se evidenció la capacidad de las BMDSC de llegar al tejido ovárico cuando eran administradas a través de la vena de la cola (1). De hecho, se ha descrito que el nicho ovárico es capaz de atraer células madre indiferenciadas de otros órganos, específicamente de la médula ósea, en un proceso conocido como *homing* (135).

Tras realizar un análisis interino, observamos un aumento de la reserva ovárica en ambas ramas del estudio, tanto con inyección de las células en la arteria ovárica como únicamente con movilización a sangre periférica. Dado que

el tamaño muestral del estudio aún es pequeño (10 pacientes reclutadas hasta la fecha), los resultados no son estadísticamente significativos. Se evidenció un crecimiento folicular en 7 pacientes, que formaban parte de ambas ramas del estudio, y más llamativo en los últimos 3 meses de seguimiento. De la misma manera, la AMH ascendió en 3 de las pacientes reclutadas

Esto nos hace pensar, que si el tratamiento únicamente con G-CSF es efectivo, podría ser válido como terapia alternativa, dado que resulta un tratamiento mucho menos invasivo que el tratamiento ASCOT, y por tanto con menos efectos secundarios y mayor seguridad para la paciente. Por ello, para el futuro, debemos centrarnos en terapias en donde únicamente se administre el tratamiento con G-CSF vía subcutánea, para la liberación de células madre al torrente sanguíneo, y su liberación de factores solubles desde sangre periférica.

En cuanto a los otros marcadores como el estradiol y la FSH, que monitorizaban una normalización de los valores analíticos desde valores menopáusicos a valores reproductivos, se observó una mejoría: presenciamos una disminución de los valores de FSH en 6 mujeres reclutadas, y en el estradiol se evidenciaron picos de ascenso de sus niveles coincidiendo con el crecimiento folicular, pero debido al bajo tamaño muestral, tampoco se advirtieron diferencias significativas. Estas alteraciones hormonales se correlacionaron con la mejoría de sintomatología climatérica, presente durante el seguimiento en más de la mitad de las pacientes, que incluía alivio de los sofocos en un 50% de las pacientes y disminución de la sequedad vaginal. Además, tras la finalización del estudio, dos pacientes presentaron menstruaciones regulares, cada una perteneciente a una rama del estudio.

Así mismo, se evidenció un aumento en número de ciclos FIV realizados, principalmente dado que este grupo de pacientes habían realizado pocos ciclos de reproducción previo al estudio, puesto que el diagnóstico de POI es de muy mal pronóstico reproductivo. De igual modo, tras FIV, se constató un aumento en la tasa de folículos puncionados, MII obtenidos (4 ovocitos obtenidos hasta la fecha), con 2 embriones generados, y una gestación evolutiva.

Todas estas mejoras en la reserva ovárica, valores hormonales, y retorno de la menstruación fueron más evidentes al final del seguimiento. El crecimiento folicular se acentuó en los últimos 3 meses de seguimiento (entre los días 90 y 140), mientras que en dos de las pacientes reclutadas, los valores de FSH se redujeron a la mitad, y todo esto a final del periodo de seguimiento. Así mismo, pese a que 4 pacientes reportaron alguna menstruación en algún punto del seguimiento, no fue hasta 6 meses tras la terapia con BMDSC cuando se informaron menstruaciones regulares. Todo ello, se ha visto relacionado con el reclutamiento de los folículos primordiales, tras ser estimulados por las BMDSC.

Hasta la fecha hay varios estudios publicados que arrojan esta misma teoría de la recuperación de folículos primordiales durmientes.

Otro acontecimiento que corrobora este crecimiento folicular tardío es el hecho de que en pacientes POI de nuestro estudio se inició en casi un 70% los ciclos de FIV en los últimos 3 meses de seguimiento, dado que fue entonces cuando se observó un crecimiento folicular.

Por consiguiente, analizando los estudios publicados en humanos reportados hasta ahora, junto con nuestros resultados en pacientes POR y POI (ASCOT-1 y ASCOT-2), podemos arrojar la hipótesis de una foliculogénesis precoz, dos semanas tras la técnica con BMDSC, y otra tardía, entre 5 y 6 meses tras la terapia aproximadamente, cuando comienza el crecimiento folicular a partir de los folículos primordiales que se encontraban durmientes en los ovarios.

La teoría de la foliculogénesis precoz se debe al reclutamiento o rescate de los folículos secundarios, que, por tanto, ya habían comenzado su desarrollo desde folículos primordiales tal y como se ha detallado al principio de la discusión y que se benefician de la regeneración del nicho ovárico en el que se desarrollan. Las pacientes POR tienen un bajo número de folículos antrales, aunque eso no descarta la presencia de folículos secundarios o preantrales. En cambio, en pacientes POI, estos folículos ya no se encuentran, dado que su función ovárica está aún más alterada que las pacientes POR, y por eso en este tipo de pacientes, no vamos a observar la primera oleada de crecimiento de AFC. Sin embargo, a pesar de que el ovario no funciona, existe en ellas un pool residual

de folículos primordiales durmientes que parecen ser rescatados para su activación y crecimiento por la técnica ASCOT(136).

La foliculogénesis tardía puede ser debida a lo siguiente. En una foliculogénesis fisiológica, los folículos primordiales van a crecer hasta folículo primario, de ahí a folículo secundario o preantral (<0.1 – 0.2 mm), y posteriormente alcanzaran la fase de folículo antral temprana. De estos folículos preantrales, una cohorte será seleccionada en cada ciclo menstrual para formar los folículos antrales. Posteriormente, uno de los folículos antrales será seleccionado, para crecer de forma prioritaria, y convertirse en el folículo dominante, y continuará creciendo hasta alcanzar la fase de folículo preovulatorio. Todo este proceso, desde folículo primordial hasta folículo preovulatorio, va a tener una duración de más de 175 días (entre 5 y 6 meses), y por tanto se encuentra una conexión con este crecimiento folicular que observamos en nuestros experimentos, también tras 5 – 6 meses de seguimiento(14). Como consecuencia de este crecimiento folicular, la FSH comienza a realizar su descenso al final de los 6 meses de seguimiento, y por ello la menstruación se recuperaría 6 meses o más tarde del procedimiento con células madre(110).

La razón de porque las BMDSC favorecen la foliculogénesis, ya sea temprana o tardía, se presume que es por la mejora de la vascularización del nicho ovárico, que ya fue demostrado en los experimentos realizados por nuestro grupo en animales(1). En las pacientes POR y POI, el nicho ovárico se encuentra dañado, con una vascularización precaria, que favorece la apoptosis folicular y ovocitaria, y no permite la ovulación ni el desarrollo de estos folículos primordiales ni folículos preantrales.

Estos hallazgos, también han sido descritos por otros autores:

Kawamura en 2015, llevó a cabo la técnica IVA en humanos, en pacientes con POI. Este grupo de investigación observó un crecimiento folicular temprano en un 50% de las mujeres, que fue evidente a partir de semanas o pocos meses tras el procedimiento. No obstante, fue destacable el segundo crecimiento folicular advertido 6 meses tras el tratamiento. Con ello, la teoría es que hay dos

crecimientos foliculares como consecuencia a la técnica IVA. El crecimiento precoz, procede de los folículos secundarios, que ocurre como respuesta a la interrupción de la vía Hippo. El segundo crecimiento tardío, corresponde a una activación y desarrollo de los folículos primordiales que se encontraban de forma quiescente en el ovario (137).

Edessy et al. de nuevo vuelven a evidenciar este hallazgo. Reportaron una recuperación de los valores hormonales a niveles premenopáusicos a los 10 meses tras el tratamiento con células madre de médula ósea, mientras que previo a este momento, la paciente aún presentaba valores compatibles con POI (FSH y LH elevadas, junto con descenso del estradiol y AMH) (110).

El grupo de Silber, publicó resultados similares tras el reimplante de corteza ovárica en el tratamiento de la preservación de la fertilidad. Dichas pacientes, postmenopáusicas como consecuencia del tratamiento gonadotóxico por el cáncer, sufrieron un incremento en los valores de la hormona AMH junto con un descenso de la hormona FSH a valores reproductivos 200 días tras el reimplante de la corteza (138).

5.2.1. BMDSC: Composición celular y factores solubles liberados por las BMDSC con acción paracrina

Tras los resultados obtenidos en el primer estudio con POR (ASCOT-1), se procedió a analizar la composición celular y los factores solubles en pacientes POI durante la aféresis, para tratar constatar la existencia de cualquier correlación positiva con el incremento en la reserva ovárica. Dado que en este ensayo, existía una rama del estudio a la cual no se realizaba infusión (brazo de movilización celular con G-CSF), el análisis de las distintas poblaciones celulares se realizaba en el momento de la movilización (el quinto día tras el tratamiento con G-CSF), y a los 7 días del tratamiento, sobre las muestras de sangre periférica.

En este caso, se observó que en las pacientes POI no existió una correlación positiva entre las distintas subpoblaciones celulares, presentes en

aféresis, y la mejora de la reserva ovárica, de la misma manera que en pacientes POR.

Así mismo, en las muestras obtenidas, se determinó la concentración de factores solubles, pese a que como se ha descrito previamente en “material y métodos”, únicamente se analizaron los factores que habían demostrado tener una correlación positiva en ASCOT-1 (FGF-2 y THSP-1). En el caso de las pacientes POI, se evidenció de la misma manera una correlación positiva en ambos factores. Cabe destacar que los niveles plasmáticos cuantificados en las pacientes POI fueron mayores que los observados en el caso de las pacientes POR.

Esto es importante, dado que, en la segunda rama del estudio, movilización celular con G-CSF, no se realizó aféresis ni infusión celular en la arteria ovárica, y por tanto el aumento de los factores solubles, responsable del incremento de la reserva ovárica, va a estar directamente en la sangre periférica de las pacientes sin necesidad de realizar ninguna intervención por nuestra parte. Por tanto, se propone una nueva terapia, menos invasiva, pero con los mismos efectos sobre la liberación de factores solubles.

5.2.2. Proteómica

En cuanto al análisis del proteoma plasmático, se evaluaron así mismo las muestras de plasma obtenidas previo al tratamiento (PRE), el día de la aféresis (o en el caso del grupo de movilización, el día que finalizaban la movilización), y 3 meses tras la intervención (POST).

En este ensayo, la proteómica jugaba un papel importante, sobretodo el análisis posterior (POST), dado que su comparación tenía como objetivo identificar diferencias entre el grupo ASCOT y el grupo movilización con G-CSF para mostrar si existía un efecto adicional de la infusión. Las diferencias entre estos grupos representarían la capacidad que presentan las BMDSC en ir por sí solas a los territorios dañados y mantener la acción en el tiempo.

Tal y como era de esperar, el conjunto de muestras PRE, así como las muestras en aféresis eran homogéneas independientemente del brazo al que habían sido asignadas las pacientes, lo que pone de manifiesto la homogeneidad de la población incluida y la consistencia del proceso de movilización.

Dentro del brazo Movilización con G-CSF, las muestras proteómicas recogidas en los 3 momentos del estudio distinto (PRE-, AFERESIS, y POST-) mostraron una clara separación en el eje discriminante D1 (D1: 16.7%). Con esto se propone que la simple movilización de células madre a sangre periférica, va a ser suficiente para generar cambios a nivel proteómico sistémico, y dichos cambios van a mantenerse en el tiempo (mínimo 3 meses post movilización).

En el brazo ASCOT, así mismo se evidenció una clara separación en las muestras recogidas a lo largo del estudio (PRE-, AFERESIS, y POST-), lo cual sugiere así mismo, que ASCOT también produce cambios en el perfil proteómico del plasma sanguíneo a largo plazo, si bien estos cambios en el proteoma son distintos a los producidos únicamente por la movilización.

El siguiente punto que analizar, fue si la reinfusión de estas células, produciría mucha variación en los cambios proteómicos observados a largo plazo en comparación con la simple movilización de células madre a sangre periférica. Evidentemente, tras realizar un DA, se detectó una clara separación entre las muestras POST- de las pacientes a las que solo se les realizó la movilización y las muestras POST- de las pacientes ASCOT. De hecho las muestras de las pacientes ASCOT POST-, se solaparon con las muestras de la AFÉRESIS, lo cual indica que 2 meses y medio post aféresis el perfil proteómico plasmático de dichas pacientes era similar. No ocurrió lo mismo en las pacientes de la movilización, en donde las muestras POST- no se solaparon con las muestras recogidas durante AFÉRESIS. La separación de los perfiles POST- entre ambos grupos indica un claro efecto del proceso de reinfusión celular sobre los cambios a largo plazo, aunque las consecuencias de esta modificación a nivel reproductivo no tienen porque ser deletéreas, puesto que el crecimiento folicular aparece en ambos brazos.

5.2.3. Variabilidad

Como se ha mencionado previamente en esta discusión, el ensayo ASCOT-2, en pacientes POI, nació con la idea de homogenizar a las pacientes, tratando de disminuir la variabilidad observada en las pacientes POR. Sin embargo, las pacientes POI no son un grupo perfecto, pues dentro de la clasificación de POI se van a encontrar variaciones de este síndrome.

Ya se ha puntualizado en la introducción de esta tesis doctoral, que existe una subclasificación de las pacientes POI, en función de la clínica, los niveles de FSH, y el grado de esterilidad. Por un lado, se encuentra la POI fluctuante, de más reciente diagnóstico, en donde vamos a encontrar una FSH con variaciones de sus niveles (entre rangos postmenopáusicos y valores de normalidad), lo que genera menstruaciones puntuales (64). Por otro lado, está la POI verdadera o irreversible, con mayor tiempo desde el diagnóstico, en donde encontramos el aumento de la FSH, con oligo/amenorrea, y alteraciones de la fertilidad (16).

Lo destacable de esto, es que la proporción de folículos primordiales es mayor cuando el diagnóstico de POI es reciente (POI fluctuante), que va decreciendo conforme pasa el tiempo (65). Por tanto, el éxito de la terapia con células madre, no va a ser el mismo, en pacientes con reciente diagnóstico para POI, que con POI establecida (66,139,140).

Esta hipótesis se ha visto reforzada por varias investigaciones. Suzuki et al., realizaron el procedimiento IVA en 37 pacientes con POI, concluyendo que la respuesta al tratamiento IVA era mayor cuanto menos tiempo había pasado desde el diagnóstico de POI hasta la realización de la técnica IVA. Dichos hallazgos se correlacionaban con una mayor proporción de folículos primordiales presentes en las pacientes con reciente diagnóstico de POI, que iban en descenso conforme aumentaba el tiempo desde el diagnóstico (75). Así mismo, el grupo de Díaz-García et al. (141), rescataron los folículos primordiales tras la inhibición de la vía “hippo” mediante fragmentación ovárica, llamando a esta técnica OFFA (ovarian fragmentation for follicular activation). Reportaron una tasa gestacional en 40 mujeres del 17.5% (7 embarazos). Llama la atención, que mientras que en pacientes con POI establecida la tasa gestacional era baja (solo

2 de 28 pacientes, 7.1%), la tasa gestacional en POI fluctuante era mucho mayor (5 de 12 pacientes, 41.7%).

En nuestro estudio con pacientes POI (ASCOT-2) 9 de las pacientes reclutadas tenían una media de amenorrea de 13 meses, y por tanto se considerarían como una POI verdadera. Sin embargo, una de las pacientes, podría considerarse como POI fluctuante, puesto que la amenorrea era de 4 meses, y el diagnóstico era temprano.

5.3. Limitaciones del estudio

La mayor limitación de nuestros dos ensayos, tanto ASCOT-1 como ASCOT-2, es la carencia de un grupo control en el que no se hace ningún procedimiento o se utiliza un placebo como brazo de inyección inocua.

En realidad, ASCOT-1 fue planeado tomando un ovario como sujeto de estudio y el contralateral como control. Lo que no se esperaba es que la respuesta en términos de AFC y AMH sérica fuera igual en ambos ovarios. Este dato anulaba el diseño, pero nos daba la clave para planificar una segunda rama en ASCOT-2 con sólo movilización de células madre a sangre periférica.

El problema fundamental es la escasez de pacientes cuando nos referimos al POI. Además, difícilmente aceptarían entrar en un brazo donde el estudio, al no ser ciego, se les pudiese decir que no van a recibir tratamiento alguno. Por otro lado, resultaría poco ético incluir un grupo de pacientes POI que no recibiese tratamiento, ya que como hemos comentado, la única opción de estas pacientes para ser madres va a ser la ovodonación, y por otro lado, mientras formasen parte de un estudio en el que no recibiesen tratamiento, el tiempo correría y las pacientes cumplirían años (lo cual es perjudicial tanto para la fertilidad como para un futuro embarazo). El diseño ideal sin duda hubiese sido un ensayo clínico ASCOT-2, en donde además de nuestros dos brazos de estudio, existiese otra rama del estudio que no recibiese ningún tratamiento y realizará el seguimiento posterior de igual forma. Este debe ser obligatoriamente un diseño para un ensayo futuro. Pero no olvidemos que los actuales estudios están diseñados a

buscar las condiciones favorables, las proteínas implicadas, las composiciones celulares idóneas. En paralelo, se está trabajando en los animales de experimentación para responder a todas estas preguntas y muchas más.

Respecto a la fertilidad, sólo podemos basarnos en los datos publicados de POI por grupos con una gran experiencia. Como hemos comentado, se distinguen dos tipos de POI, el definitivo y el fluctuante. La posibilidad de embarazo espontáneo en el definitivo es del 4.4% y en el fluctuante del 17.5% (65,66,140). Mientras superemos esos rangos, podemos pensar que nuestros tratamientos son efectivos. Pero en cualquier caso el estudio randomizado con un brazo sin tratamiento es absolutamente necesario en el futuro para avanzar.

5.4. Otras terapias de rescate ovárico empleadas hasta la fecha

En la actualidad, se han empleado numerosas técnicas para promocionar el rescate ovárico, mediante un ambiente ovárico adecuado que favorezca el crecimiento folicular.

Por un lado, la técnica “IVA” propuesta por Kawamura et al. (73), con activación in vitro de la vía Hippo y activación de la vía Atk, ha sido investigada por varios autores, dados sus resultados esperanzadores y la obtención de varias gestaciones y RNV en pacientes con fertilidad comprometida y POI (74,75,77,79,80).

En otro orden de ideas, se ha estudiado en animales el uso de células madre adultas procedentes de otros orígenes. Por un lado, se han empleado, las células madre mesenquimales, derivadas de cordón umbilical, evidenciando desarrollo folicular, retorno de los ciclos, junto con recuperación de la fertilidad incluso la generación de descendencia en algunos animales (92,101,102). Por otro lado, otros investigadores han empleado las células mesenquimales procedentes de líquido amniótico. Se ha demostrado una mejoría de la función ovárica y retorno de la fertilidad en ratones, con una estimulación de la foliculogénesis (104,105).

También se ha investigado el uso de células epiteliales y mesenquimales de la membrana amniótica de origen humano, utilizadas posteriormente en animales, y demostrando una restauración de la foliculogénesis y síntesis hormonal (106). Las células madre mesenquimales del tejido adiposo, y las células mesenquimales obtenidas desde médula ósea (tras ser separadas y cultivadas), en animales, también provocaron un retorno de la función ovárica (107,108).

Así mismo, existen otras investigaciones en humanos, que también han empleado células madre procedentes de médula ósea, pero tras punción directa de la cresta iliaca. Dicha técnica resulta mucho más invasiva y molesta para las pacientes, en comparación con la técnica de movilización con G-CSF. Además, conlleva un aislamiento posterior de las células mesenquimales procedentes de la médula ósea, con cultivo posterior, lo que acarrea un potencial riesgo de perder las cualidades regenerativas de las células mesenquimales. Por un lado, está la investigación de Gupta et al., en 2018, que reportaron un RNV en una mujer postmenopáusica tras aspiración directa de médula ósea e inyección intra-ovárica por laparoscopia(109).

Esta técnica ya había ido descrita previamente por Edessy et al., en 10 pacientes con POI, consiguiendo el nacimiento de un RNV (110). Otros investigadores realizaron una variación de esta técnica: Gabr et al. diseñaron un estudio con 30 mujeres con POI idiopática, en donde a un grupo de pacientes se les inyectaban las células madre derivadas de médula ósea vía laparoscópica, pero un segundo grupo se inyectaban las células mediante cateterización de la arteria ovárica. La mejoría hormonal reportada fue muy satisfactoria, hasta en un 86.7% de las pacientes, siendo esta mejoría de larga duración. No obstante, únicamente reportaron una gestación, lo que conlleva una tasa gestacional del 3.3%.

El grupo de Al Hendy (111), también está realizando ensayos clínicos en humanos con células madre mesenquimales procedentes de médula ósea, siguiendo la misma técnica anterior, pese que los resultados publicados hasta la fecha son los obtenidos en animales (112).

5.5. Futuras alternativas para el tratamiento de pacientes

Pese a que el tratamiento con células madre derivadas de médula ósea plantea una terapia novedosa, no todo finaliza aquí. Se están llevando a cabo numerosas investigaciones, que plantean nuevas alternativas en el tratamiento y prevención del envejecimiento ovárico.

Algunos investigadores han estudiado el uso de sustancias que reviertan el envejecimiento ovárico o que intervengan en la dinámica celular del ovario.

Es el caso de Kano et al., que ha investigado acerca de la sustancia inhibidora Mülleriana (MIS o *del inglés, müllerian inhibitory substance*), también llamada AMH, como regulación negativa de la activación de los folículos primordiales. Los experimentos de este grupo de investigación expusieron que el uso de la hormona AMH de forma exógena, sería una opción válida para detener el efecto deletéreo de la quimioterapia, y de esta forma evitar la atresia folicular que esta produce. Por tanto, proponen el uso de la AMH como terapia en la prevención de la caída de la reserva ovárica(26).

Bertoldo et al. proponen una nueva alternativa para revertir el envejecimiento ovárico. Se trata del tratamiento con NAD + (*del inglés, nicotinamide adenine dinucleotide*), un precursor del NMN (*del inglés, nicotinamide mononucleotide*). El NAD+, se ha relacionado con la mejoría de la calidad ovocitaria en animales, lo que conllevaría una restauración de la fertilidad. De hecho, con el envejecimiento, se ha identificado una disminución en los niveles de NAD+, lo que implica una disminución en la calidad ovocitaria e infertilidad. Por ello, la suplementación farmacológica con NAD+ podría ser una nueva alternativa terapéutica para reestablecer el daño producido en los ovarios como consecuencia de la edad (142).

Otros grupos de investigación han empleado las células madres y han ido un paso más allá. Es el caso de Hayashi et al. Este grupo de investigación, ha obtenido células madre de la oreja del ratón (fibroblastos), de ahí consiguió

generar ovocitos de ratón, para obtener embriones que dieron lugar a nuevos ratones, y de ahí obtuvo nuevas células madre (143).

Basándose en el mecanismo regenerativo paracrino de las células madre, recientemente se ha propuesto el uso de plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP, también libera factores solubles de forma paracrina, consiguiendo así un efecto regenerativo que podría ser beneficioso en ovarios dañados como los de pacientes con POI y POR. Con ello, Pantos et al., emplearon una técnica novedosa, mediante la infusión directa de PRP en el ovario, por medio de la inyección vaginal ecoguiada. Los datos publicados recogen resultados en 8 mujeres perimenopáusicas, todas ellas con una edad superior a 40 años (entre 41 y 49 años). Reportaron el retorno de la menstruación en todas las pacientes, realizando varios ciclos de FIV con la preservación de 1.50 ± 0.71 embriones (144). Tres años después, el mismo grupo, describe resultados similares a los anteriores en 3 mujeres: 2 mujeres postmenopáusicas y una mujer con POI. Todas ellas gestaron tras el tratamiento con PRP (145).

Ensayos clínicos posteriores, han tratado de explicar el mecanismo de acción de las PRP (146), y a su vez han demostrado una mejoría en los valores hormonales (estradiol y FSH) y obtención de blastocistos, en pacientes con baja reserva ovárica. Otro estudio ha reportado 3 gestaciones tras PRP en pacientes POI (147).

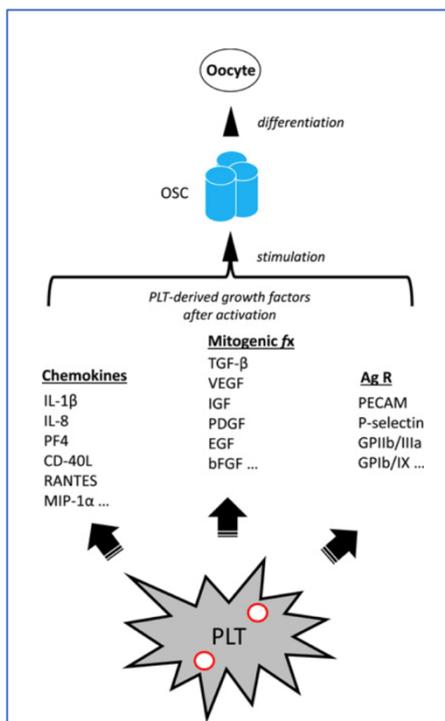


Figura 43: Mecanismo de acción por el cual las PRP activadas activan la función ovárica. Las PRP autólogas activadas liberan tres clases de mediadores moleculares, como se muestran en la figura, relacionados con una activación posterior de la función ovárica (146).

De hecho, ensayos clínicos en animales, ya han combinado el efecto beneficioso de la inyección de BMDSC junto con PRP. Esta terapia novedosa demostró una restauración acelerada de la función ovárica en un modelo animal de POI inducido por quimioterapia, (comparada con las otras dos técnicas de forma individual), gracias a un aumento de la neovascularización ovárica, y una reducción de la apoptosis de las células de la granulosa mediante la reducción de la expresión de la proteína pro-apoptótica BAX y un aumento de la anti-apoptótica Bcl-2, lo que favoreció la foliculogénesis (106,148).

Por consiguiente, para el futuro, proponemos la combinación de ambas terapias. En base a todo esto, decidimos evaluar una posible alternativa al tratamiento ASCOT basada en la infusión del plasma enriquecido en estos factores de crecimiento tras la movilización de las BMDSC a sangre periférica mediante un tratamiento con G-CSF.

Para ello, hemos iniciado experimentos preliminares en un modelo murino de POI, donde mediante la infusión de este plasma movilizado, enriquecido y activado obtuvimos en ratones POI un aumento del potencial reproductivo a corto y largo plazo. Observamos un aumento del número de folículos preovulatorios, MII ovulados y embriones, así como una regeneración del nicho ovárico mediante disminución de la apoptosis, aumento de la proliferación de las células de la granulosa y mejora de la vascularización local del ovario. A largo plazo, se observó un aumento de la tasa de gestación (40% tratados vs. 0% control POI) y un mayor número de crías, que mostraron ser sanas hasta la edad adulta (manuscrito en preparación). La infusión del plasma movilizado, pero sin activar, fue capaz de reproducir, aunque en menor medida parte de los efectos regenerativos observados con el tratamiento que llamaremos 4-step ASCOT debido a los cuatro pasos que lo componen, movilización, concentración PRP, activación e inyección.

En conclusión, tras nuestros hallazgos en ambas investigaciones, el uso de células derivadas de médula ósea (BMDSC), ya sea empleando aféresis y posterior infusión celular en la arteria ovárica, o no, es una técnica reproducible, y semi-invasiva, con resultados prometedores, tanto en pacientes POR como en pacientes POI.

Sin embargo, se necesitan más trabajos de investigación, con mayor población y mayor seguimiento, antes de validar esta técnica como una alternativa real en pacientes con su reserva ovárica alterada.



6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los estudios ASCOT-1 y ASCOT-2 sobre el rescate del ovario en situaciones de déficit de desarrollo folicular nos han proporcionado una base de “prueba de concepto” importante para seguir invirtiendo tiempo y recursos en esta línea de investigación. Somos conscientes de que queda un largo camino por recorrer (e incluso finalizar el ensayo ASCOT-2) pero algunas conclusiones de esta Tesis Doctoral son de mucho interés de cara al futuro. Las más relevantes serían:

1. La inyección de BMDSC mediante cateterismo próxima a la corteza del ovario (arteria ovárica) se asocia con una movilización folicular evidenciada por incremento de los niveles séricos de AMH y/o recuento de folículos antrales en el 74 % de las mujeres tratadas con POR.
2. El efecto en realidad es sistémico, ya que se observa tanto en el ovario tratado como en el control.
3. El efecto positivo tiene dos ondas o momentos de aparición, a los 15 días del procedimiento y a los 120. Esto sugiere que primero se actúa sobre folículos secundarios y con más calma y a largo plazo sobre los folículos primordiales.
4. La existencia a largo plazo de gestaciones espontáneas en el estudio ASCOT-1 demuestra que esa acción positiva existe y persiste a largo plazo.
5. Este efecto es vehiculado por la presencia de algunas proteínas específicas como FGF-2 y THSP-1, que han demostrado tener una correlación positiva con el aumento de la reserva ovárica en pacientes POR.
6. No mejora la calidad ovocitaria, dado la elevada tasa de aneuploidía, sin embargo, si que mejora la reserva ovárica.
7. El estudio ASCOT-2, aunque presentando aquí resultados parciales, nos confirma que incluso en mujeres con POI las BMDSC son capaces de promover el desarrollo folicular.

8. El efecto positivo sobre el desarrollo folicular se detecta en los meses 3 - 5, lo que se correspondería con la activación de los folículos primordiales.
9. Son capaces de revertir los síntomas climatéricos causados por el fallo ovárico en casi la mitad de las mujeres, detectándose una recuperación de la menstruación en dos de ellas.
10. Parece funcionar tanto la simple movilización de las BMDSC como el propio ASCOT. Por tanto, el BMDSC tras movilización, sin necesidad de aféresis ni infusión celular en la arteria ovárica, es una técnica reproducible, y mucho menos invasiva que la técnica ASCOT, aún mostrando los resultados prometedores de la anterior.
11. Se ha realizado transferencia embrionaria en 2 pacientes, y se ha conseguido un embarazo en una mujer con POI, lo cual supone un gran avance en pacientes con valores hormonales en rango menopáusico, oligomenorrea, y ausencia de folículos antrales los cuales ser estimulados.

Con todo ello, se trata de unas investigaciones con resultados muy prometedores, tras usar células BMDSC de forma semi-invasiva.

Sin embargo, se necesitan más trabajos de investigación, con mayor población y un seguimiento más prolongado, antes de validar esta técnica como una alternativa real en pacientes con su reserva ovárica alterada.



7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Herraiz S, Buigues A, Díaz-García C, Romeu M, Martínez S, Gómez-Seguí I, et al. Fertility rescue and ovarian follicle growth promotion by bone marrow stem cell infusion. *Fertil and Steril*. 2018;109(5):908-918.
2. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med*. 2012;9(12):1–12.
3. Evers LH. Female subfertility. *Lancet*. 2002;360(7):151–9.
4. Mills M, Rindfuss RR, McDonald P, te Velde E. Why do people postpone parenthood? Reasons and social policy incentives. *Hum Reprod Update*. 2011;17(6):848–60.
5. Margolis R, Verdery AM. A Cohort Perspective on the Demography of Grandparenthood: Past, Present, and Future Changes in Race and Sex Disparities in the United States. *Demography*. 2019;56(4):1495–1518.
6. Adserà A. Changing fertility rates in developed countries. The impact of labor market institutions. *J of Pop Econ*. 2004;17(1):17–43.
7. Liu KE, Case A. Advanced Reproductive Age and Fertility. *J Obstet Gynaecol Can*. 2011;33(11):1165–1175.
8. Maheshwari A, Porter M, Shetty A, Bhattacharya S. Women's awareness and perceptions of delay in childbearing. *Fertil and Steril*. 2008;90(4):1036–42.
9. García D, Brazal S, Rodríguez A, Prat A, Vassena R. Knowledge of age-related fertility decline in women: A systematic review. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*. 2018;230:109–18.
10. Vollenhoven B, Hunt S. Ovarian ageing and the impact on female fertility. *F1000Res*. 2018;7(1835):1–6.

11. Cobo A, García-Velasco J, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Elective and Onco-fertility preservation: Factors related to IVF outcomes. *Hum Reprod.* 2018; 33(12):2222-2231.
12. Patel A, Sharma PSVN, Kumar P. "In cycles of dreams, despair, and desperation:" *J Hum Reprod Sci.* 2018;11(4):320–8.
13. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Wimalasena J, Ayala ME, Dominguez R. Oogenesis in adult mammals, including humans. *Endocrine.* 2005;26(3):301–16.
14. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: A review. *Hum Reprod Update.* 2012;18(1):73–91.
15. Wallace WHB, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS ONE.* 2010;5(1):1–9.
16. POI Guideline Development Group. Management of women with premature ovarian insufficiency. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod.* 2016;31(5):926-37
17. Yildirim E, Aksoy S, Onel T, Yaba A. Gonadal development and sex determination in mouse. *Reprod Biol.* 2020;(March) Available from: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020;01.007>
18. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Characterization of Ovarian Follicular Wave Dynamics in Women1. *Biol Reprod.* 2003;69(3):1023–31.
19. Ecochard R. Side of ovulation and cycle characteristics in normally fertile women. *Hum Reprod.* 2000;15(4):752–5.
20. Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci.* 2000;60–61:61–79.
21. Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K. Chemotherapy-induced damage to ovary: Mechanisms and clinical impact. *Future Oncol.* 2016;12(19):2333–

- 44.
22. Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Revi.* 2015;36(1):1–24.
23. Devesa J, Caicedo D. The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis. *Front Endocrinol.* 2019;10(7):1–17.
24. Munné S, Cohen J, Sable D. Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil and Steril.* 2002;78(2):234–6.
25. Richardson RB, Allan DS, Le Y. Greater organ involution in highly proliferative tissues associated with the early onset and acceleration of ageing in humans. *Exp Gerontol.* 2014;55:80–91.
26. Kano M, Sosulski AE, Zhang LH, Saatcioglu HD, Wang D, Nagykerly N, et al. AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(9):E1688–97.
27. Rossi V, Lispi M, Longobardi S, Mattei M, Rella F Di, Salustri A, et al. LH prevents cisplatin-induced apoptosis in oocytes and preserves female fertility in mouse. *Cell Death and Differ.* 2017;24(1):72–82.
28. Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod BioMed Online.* 2015;31(4):486–96.
29. ESHRE Reproductive Endocrinology Guideline Group. Controlled Ovarian Stimulation for IVF / ICSI. *European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)* 2019; 1–134.
30. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *American J Obstet Gynecol.* 2017;217(2):129–40.
31. Labarta E, Bosch E, Mercader A, Alamá P, Mateu E, Pellicer A. A Higher Ovarian Response after Stimulation for IVF Is Related to a Higher Number of Euploid Embryos. *BioMed Res Int.* 2017;2017.

32. Garcia J, Jones G, Acosta A, Wright JG. Human menopausal gonadotropin:human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspirati. *Fertil and Steril*. 1983;39(2):174–9.
33. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1616–24.
34. Hu L, Bu Z, Guo Y, Su Y, Zhai J, Sun Y. Comparison of different ovarian hyperstimulation protocols efficacy in poor ovarian responders according to the bologna criteria. *Int J of Clin Exp Med*. 2014;7(4):1128–34.
35. Alviggi C, Andersen CY, Buehler K, Conforti A, De Placido G, Esteves SC, et al. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept.*Fertil and Steril*. 2016;105(6):1452–3.
36. Klinkert ER, Broekmans FJM, Looman CWN, Habbema JDF, te Velde ER. Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: A randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2005;20(3):611–5.
37. Youssef MA, Van Wely M, Al-Inany H, Madani T, Jahangiri N, Khodabakhshi S, et al. A mild ovarian stimulation strategy in women with poor ovarian reserve undergoing IVF: A multicenter randomized non-inferiority trial. *Hum Reprod*.2017. 32(1):112–8.
38. Surrey ES, Schoolcraft WB. Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. Vol. 73, *Fertil and Steril*. 2000.73(4): 667–76.
39. Fábregues F, Peñarrubia J, Creus M, Manau D, Casals G, Carmona F, et al. Transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in low-responder IVF patients: A randomized, clinical trial. *Hum Reprod*. 2009;24(2):349–59.

40. Gonzalez-Comadran M, Duran M, Sola I, Fabregues F, Carreras R, Checa MA. Effects of transdermal testosterone in poor responders undergoing IVF : systematic review and meta-analysis. *Reprod BioMed Online*. 2012;25(5):450–9.
41. Bosdou JK, Venetis CA, Kolibianakis EM, Toulis KA, Goulis DG, Zepiridis L, et al. The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012; 8(2):127–45.
42. Fàbregues F, Solernou R, Ferreri J, Guimerà M, Peralta S, Casals G, et al. Original article Comparison of GnRH agonist versus luteal estradiol GnRH antagonist protocol using transdermal testosterone in poor responders. *JBRA Assist Reprod*. 2019;23(2):130–6.
43. Garcia-Velasco JA. The use of aromatase inhibitors in in vitro fertilization. *Fertil and Steril*. 2012;98(6):1356–8.
44. Lee VCY, Chan CCW, Ng EHY, Yeung WSB, Ho PC. Sequential use of letrozole and gonadotrophin in women with poor ovarian reserve: A randomized controlled trial. *Reprod BioMed Online*. 2011;23(3):380–8.
45. Sekhon L, Lee JA, Whitehouse M, Copperman AB, Grunfeld L. Letrozole as an adjunct in GnRH antagonist cycles improves IVF outcome in poor responders. *Fertil and Steril*. 2014;102(3):e221.
46. Rodriguez-Wallberg K, Oktay K. Fertility preservation in women with breast cancer. *Clin Obstet Gynecol*. 2010;53(4):753–62.
47. Dunne C, Seethram K, Roberts J. Growth Hormone Supplementation in the Luteal Phase Before Microdose GnRH Agonist Flare Protocol for In Vitro Fertilization. *J Obstet Gynaecol Can*. 2015;37(9):810–5.
48. Dosouto C, Calaf J, Polo A, Haahr T, Humaidan P. Growth Hormone and Reproduction: Lessons Learned From Animal Models and Clinical Trials. *Front Endocrinol*. 2019;10(6):1–7.

49. Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonäuer LM, Righini C, De Ziegler D, Frydman R. Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. *Fertil and Steril*. 2003;79(3):585–9.
50. Nassar J, Tadros T, Adda-Herzog E, Ayoubi JM, Fanchin R. Steroid hormone pretreatments in assisted reproductive technology. *Fertil and Steril*. 2016;106(7):1608–14.
51. Marzal Escriva A, Diaz-Garcia C, Monterde M, Rubio JM, Pellicer A. Antral follicle priming before intracytoplasmic sperm injection in previously diagnosed low responders: A randomized controlled trial (FOLLPRIM). *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(7):2597–605.
52. Teramoto S, Kato O. Minimal ovarian stimulation with clomiphene citrate: A large-scale retrospective study. *Reprod BioMed Online*. 2007;15(2):134–48.
53. Labarta E, Marin D, Remohí J, Bosch E. Conventional versus minimal ovarian stimulation: an intra-patient comparison of ovarian response in poor-responder women according to Bologna Criteria. *Reprod BioMed Online*. 2018;37(4):434–41.
54. Ochin H, Ma X, Wang L, Li X, Song J, Meng Y, et al. Low dose clomiphene citrate as a mild stimulation protocol in women with unsuspected poor in vitro fertilization result can generate more oocytes with optimal cumulative pregnancy rate. *J of Ovarian Res*. 2018;11(1):1–6.
55. Cobo A, Garrido N, Crespo J, José R, Pellicer A. Accumulation of oocytes: A new strategy for managing low-responder patients. *Reprod BioMed Online*. 2012;24(4):424–32.
56. Ortega I, García-Velasco JA, Pellicer A. Ovarian manipulation in ART: going beyond physiological standards to provide best clinical outcomes. *J Assis Reprod Gen*; 2018; 35(10):1751-1762

57. Rombauts L, Suikkari AM, MacLachlan V, Trounson AO, Healy DL. Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertil and Steril*. 1998;69(4):665–9.
58. Kuang Y, Chen Q, Hong Q, Lyu Q, Ai A, Fu Y, et al. Double stimulations during the follicular and luteal phases of poor responders in IVF/ICSI programmes (Shanghai protocol). *Reprod BioMed Online*. 2014;29(6):684–91.
59. Vaiarelli A, Cimadomo D, Trabucco E, Vallefucio R, Buffo L, Dusi L, et al. Double stimulation in the same ovarian cycle (DuoStim) to maximize the number of oocytes retrieved from poor prognosis patients: A multicenter experience and SWOT analysis. *Front Endocrinol*. 2018;9(6):317
60. Vaiarelli A, Cimadomo D, Conforti A, Schimberni M, Giuliani M, D'Alessandro P, et al. Luteal phase after conventional stimulation in the same ovarian cycle might improve the management of poor responder patients fulfilling the Bologna criteria : a case series. *Fertil and Steril*. 2020;113(1):121–30.
61. Tucker EJ, Grover SR, Bachelot A, Touraine P, Sinclair AH. Premature Ovarian Insufficiency: New Perspectives On Genetic Cause And Phenotypic Spectrum. *Endocr Rev*. 2016;37(6):609–35.
62. Gargus E, Deans R, Anazodo A, Woodruff TK. Management of Primary Ovarian Insufficiency Symptoms in Survivors of Childhood and Adolescent Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16(9):1137–49.
63. De Vos M, Devroey P, Fauser BC. Primary ovarian insufficiency. *Lancet*. 2010;376(9744):911–21.
64. Díaz B, Fontes J, Galliano D, Gallo J, García A, Llana P, et al. Menopausia Precoz. *Menopausia AEEM*. 2014;1–36.
65. Bidet M, Bachelot A, Bissauge E, Golmard JL, Coussieu C, Badachi Y, et al. Resumption of Ovarian Function and Pregnancies in 358 Patients with

- Premature Ovarian Failure. *J Clin Endocrinol and Metab.* 2011;96(12):3864–72.
66. Bachelot A, Nicolas C, Bidet M, Dulon J, Leban M, Golmard JL, et al. Long-term outcome of ovarian function in women with intermittent premature ovarian insufficiency. *Clin Endocrinol.* 2017;86(2):223–228.
67. Surrey ES, Cedars MI. The effect of gonadotropin suppression on the induction of ovulation in premature ovarian failure patients. *Fertil and Steril.* 1989;52(1):36–41.
68. Rosen GF, Stone SC, Yee B. Ovulation induction in women with premature ovarian failure: A prospective, crossover study. *Fertil and Steril.* 1992;57(2):448–9.
69. Van Kasteren YM, Schoemaker J. Premature ovarian failure: A systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Update.* 1999;5(5):483–92.
70. Welt C, Hall J, Adams J, Taylor A. Editorial: Mutant extracellular calcium-sensing receptors and severity of disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):1246–8.
71. García D, Brazal S, Rodríguez A, Prat A, Vassena R, Liu KE, et al. Management of women with premature ovarian insufficiency. *Fertil and Steril.* 2015;39(6):1616–24.
72. Herraiz S, Pellicer N, Romeu M, Pellicer A. Treatment potential of bone marrow-derived stem cells in women with diminished ovarian reserves and premature ovarian failure. *Curr opin Obstet Gynecol.* 2019;31(3):156–62.
73. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013;110(43):17474-9

74. Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJW. Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure?. *Curr opin Obstet Gynecol.* 2017;28(3):217–22.
75. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2015;30(3):608–15.
76. Zhai J, Yao G, Dong F, Bu Z, Cheng Y, Sato Y, et al. In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(11):4405–12.
77. Tanaka A, Nagayoshi M, Yamaguchi T, Ichiyama T, Shimada M, Kawamura K. Induction of follicle development in poor responder patients based on modified in vitro activation (MIVA) approach. *Fertil and Steril.* 2017;108(3):e221–2.
78. Tanaka A, Nagayoshi M, Tanaka I, Yamaguchi T, Ichiyama T, Ohno M, et al. Successful drug-free IVA (in vitro activation) approach with laparoscopy to increase viable embryos in poor responder (POR) patients. *Fertil and Steril.* 2018;110(4):e325.
79. Fabregues F, Ferreri J, Calafell JM, Moreno V, Borrás A, Manau D, et al. Pregnancy after drug-free in vitro activation of follicles and fresh tissue autotransplantation in primary ovarian insufficiency patient: A case report and literature review. *J Ovarian Res.* 2018;11(1):1–5.
80. Lunding SA, Pors SE, Kristensen SG, Landersoe SK, Jeppesen JV, Flachs EM, et al. Biopsying, fragmentation and autotransplantation of fresh ovarian cortical tissue in infertile women with diminished ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2019;34(10):1924–36.
81. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):71.

82. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204–19.
83. Neves J, Sousa-Victor P, Jasper H. Rejuvenating Strategies for Stem Cell-Based Therapies in Aging. *Cell Stem Cell*. 2017;20(2):161–175.
84. Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, Frolova G. Heterotopic of bone marrow. *Transplantation*. 1968;6(2):230–47.
85. Hirschi KK, Goodell MA. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther*. 2002;9(10):648–52.
86. Zhang M, Huang B. The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(6):48.
87. Odabas S, Elçin AE, Elçin YM. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells. *Methods Mol Bio*. 2014;1109:47–63.
88. Narbona-Carceles J, Vaquero J, Suárez-Sancho SBS, Forriol F, Fernández-Santos ME. Bone marrow mesenchymal stem cell aspirates from alternative sources: Is the knee as good as the iliac crest?. *Injury*. 2014;45:S42–7.
89. Ludke A, Li RK, Weisel RD. The Rejuvenation of Aged Stem Cells for Cardiac Repair. *Can J Cardiol*. 2014;30(11)1299–306.
90. Castellano JM, Kirby ED, Wyss-Coray T. Blood-borne revitalization of the aged brain Aging as a multi-system problem. *JAMA Neurol*. 2015;72(10):1191–4.
91. Price CA. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian. *J Endocrinol*. 2016;228(2):R31–43.
92. Wang S, Yu L, Sun M, Mu S, Wang C, Wang D, et al. The Therapeutic Potential of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Mice Premature Ovarian Failure. *BioMed Res Int*. 2013; 2013:690491
93. Hershlag A, Schuster MW. Return of fertility after autologous stem cell

- transplantation. *Fertil and Steril*. 2002;77(2):419–21.
94. Veitia RA, Gluckman E, Fellous M, Soulier J. Recovery of Female Fertility After Chemotherapy, Irradiation, and Bone Marrow Allograft: Further Evidence Against Massive Oocyte Regeneration by Bone Marrow-Derived Germline Stem Cells. *Stem Cells*. 2007;25(5):1334–5.
95. 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):303–15.
96. Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 2006;441(7097):1109–14.
97. White YAR, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med*. 2012;18(3):413–21.
98. Woods DC, Tilly JL. Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human ovaries. *Nat Protoc*. 2013;8(5):966–88.
99. Zhang H, Panula S, Petropoulos S, Edsgård D, Busayavalasa K, Liu L, et al. Adult human and mouse ovaries lack DDX4-expressing functional oogonial stem cells. *Nat Med*. 2015;21(10):1116–8.
100. Wagner M, Yoshihara M, Douagi I, Damdimopoulos A, Panula S, Petropoulos S, et al. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. *Nat Commun*. 2020;11(1):1147.
101. Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model. *BioMed Res Int*. 2016;6(3): 2517514..
102. Zhu SF, Hu HB, Xu HY, Fu XF, Peng DX, Su WY, et al. Human umbilical

- cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries. *J Cell Mol Med*. 2015;19(9):2108–17.
103. Mohamed SA, Shalaby S, Brakta S, Elam L, Elsharoud A, Al-Hendy A. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells as an infertility treatment for chemotherapy induced premature ovarian insufficiency. *Biomedicines*. 2019;7(1):E7
 104. Liu T, Huang Y, Guo L, Cheng W, Zou G. CD44+/CD105+ human amniotic fluid mesenchymal stem cells survive and proliferate in the ovary long-term in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Int J Med Sci*. 2012;9(7):592–602.
 105. Guan-Yu X, I-Hsuan L, Chun-Chun C, Chia-Chun C, Yen-Hua L, Winston TKC, et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS ONE*. 2014;9(9):1–10.
 106. Ding C, Li H, Wang Y, Wang F, Wu H, Chen R, et al. Different therapeutic effects of cells derived from human amniotic membrane on premature ovarian aging depend on distinct cellular biological characteristics. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):173.
 107. Sun M, Wang S, Li Y, Yu L, Gu F, Wang C, et al. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem Cell Res Ther* . 2013;4(4):80.
 108. Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, El-Shal AS, Raafat N, Shabrawy SM, et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy*. 2013;15(1):64–75.
 109. Gupta S, Lodha P, Karthick MS, Tandulwadkar SR. Role of Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cell Therapy for Follicular Recruitment in Premature Ovarian Insufficiency: Review of Literature and a Case Report of World's First Baby with Ovarian Autologous Stem Cell Therapy in a Perimenopausal Woman of Age. *J Hum Reprod Sci*. 2018;11(2):125–30.

110. Edessy M, Hosni H, Shady Y, Waf Y, Bakr S, Kamel M. Autologous stem cells therapy, The first baby of idiopathic premature ovarian failure. *Acta Med Int.* 2016;3(1):19-23.
111. Gabr H, Elkheir WA, El-Gazzar A. Autologous stem cell transplantation in patients with idiopathic premature ovarian failure. *J Tissue Sci Eng.* 2016;7(3): 2157-7552.
112. Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, Brakta S, Hill WD, Ismail N, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reprod Sci.* 2018;25(1):51–63.
113. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov A V., Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14440–5.
114. Saenz-de-Juano MD, Vicente JS, Hollung K, Marco-Jiménez F. Effect of embryo vitrification on rabbit foetal placenta proteome during pregnancy. *PLoS ONE.* 2015;10(4): e0125157.
115. Shilov I V., Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, et al. The paragon algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6(9):1638–55.
116. Pellicer A, Ardiles G, Neuspiller F, Remohí J, Simón C, Bonilla-Musoles F. Evaluation of the ovarian reserve in young low responders with normal basal levels of follicle-stimulating hormone using three-dimensional ultrasonography. *Fertil and Steril.* 1998;70(4):671–5.
117. Herraiz S, Romeu M, Buigues A, Martínez S, Díaz-García C, Gómez-Seguí I, et al. Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders. *Fertil and Steril.* 2018;110(3):496-505.

118. Gleicher N, Vidali A, Barad DH. Successful treatment of unresponsive thin endometrium. *Fertil and Steril*. 2011;95(6):2123.e13-2123.e17.
119. Skaznik-Wikiel ME, McGuire MM, Sukhwani M, Donohue J, Chu T, Krivak TC, et al. Granulocyte colony-stimulating factor with or without stem cell factor extends time to premature ovarian insufficiency in female mice treated with alkylating chemotherapy. *Fertil and Steril*. 2013;99(7):2045-2054.
120. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004;428(6979): 145-50.
121. Chaves R, de Matos M, Buratini Jr J, de Figueiredo J. The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. *Reprod, Fertil Dev*. 2012;24(4):905–15.
122. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and -2. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12(5):634–40.
123. Thomas FH, Wilson H, Silvestri A, Fraser HM. Thrombospondin-1 expression is increased during follicular atresia in the primate ovary. *Endocrinology*. 2008;149(1):185–92.
124. Osz K, Ross M, Petrik J. The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12(3):21.
125. Cervelló I, Gil-Sanchis C, Santamaría X, Cabanillas S, Díaz A, Faus A, et al. Human CD133+ bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertil and Steril*. 2015;104(6):1552-1560.
126. Santamaria X, Cabanillas S, Cervelló I, Arbona C, Raga F, Ferro J, et al. Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: A pilot cohort study. *Hum Reprod*. 2016;31(5):1087–96.

127. el-Roeiy A, Chen X, Roberts V, LeRoith D, Roberts C, Jr Yen S. Expression of Insulin-Like and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and Insulin Receptor Genes and Localization of the Gene Products in the Human Ovary. *J Clin Endocrinol and Metab.* 1993;77(5):1411–8.
128. Pascuali N, Scotti L, Abramovich D, Irusta G, Di Pietro M, Bas D, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor affects follicular development and ovarian proliferation, apoptosis and angiogenesis in prepubertal eCG-treated rats. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;412(9):148–58.
129. Richani D, Gilchrist RB. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2018;24(1):1–14.
130. Mohan Rao LV, Esmon CT, Pendurthi UR. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood.* 2014;124(10):1553–62.
131. Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):E1057.
132. Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, McBride AA, James ML, Berdnik D, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature.* 2017;544(7651):488–492.
133. Cobo A, García-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil and Steril.* 2016;105(3):755-764.e8.
134. Busnelli A, Papaleo E, Del Prato D, La Vecchia I, Iachini E, Paffoni A, et al. A retrospective evaluation of prognosis and cost-effectiveness of IVF in poor responders according to the Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2015;30(2):315–22.
135. Liu J, Zhang H, Zhang Y, Li N, Wen Y, Cao F, et al. Homing and

- Restorative Effects of Bone Marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Mol Cells*. 2015;37(12):865–72.
136. Visser JA, Schipper I, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(6):331–41.
137. Kawamura K, Cheng Y, Sun YP, Zhai J, Diaz-Garcia C, Simon C, et al. Ovary transplantation: To activate or not to activate. *Hum Reprod*. 2015; 30(11):2457-60
138. Silber SJ, DeRosa M, Goldsmith S, Fan Y, Castleman L, Melnick J. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(12):2205–2213.
139. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: Mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*. 2009;30(5):465–93.
140. Wakimoto Y, Fukui A, Ikezawa Y, Matsuoka M, Omote M, et al. Association between spontaneous ovulation and serum anti-Müllerian hormone levels in a premature ovarian insufficiency patient after a multimodal treatment for breast cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;45(11):2297-2301
141. Diaz-García C. Ovarian fragmentation for follicular activation (OFFA). 8th International IVI-RMA Congress (Abstract). 2019.
142. Bertoldo MJ, Listijono DR, Ho WHJ, Riepsamen AH, Goss DM, Richani D, et al. NAD⁺ Repletion Rescues Female Fertility during Reproductive Aging. *Cell Rep*. 2020;30(6):1670-1681.
143. Hayashi K, Saitou M. Perspectives of germ cell development in vitro in mammals. *Anim Sci J*. 2014;85(6):617–26.
144. Pantos K, Nitsos N, Kokkali G, Vaxevanoglou T, Markomichali C, Pantou A, et al. Ovarian rejuvenation and folliculogenesis reactivation in peri-menopausal women after autologous platelet-rich plasma treatment. 32nd

Annual Meeting of European Society Reproduction and Embryology (ESHRE); 2016;July 3–6.

145. Pantos K, Simopoulou M, Pantou A, Rapani A, Tsioulou P, Nitsos N, et al. A Case Series on Natural Conceptions Resulting in Ongoing Pregnancies in Menopausal and Prematurely Menopausal Women Following Platelet-Rich Plasma Treatment. *Cell Transplant*. 2019;28(9–10):1333–1340.
146. Sills SE, Wood SH. Autologous activated platelet-rich plasma injection into adult human ovary tissue: Molecular mechanism, analysis, and discussion of reproductive response. *Biosci Rep*. 2019;39(6): BSR20190805.
147. Farimani M, Heshmati S, Poorolajal J, Bahmanzadeh M. A report on three live births in women with poor ovarian response following intra-ovarian injection of platelet-rich plasma (PRP). *Molec Biol Rep*. 2019;46(2):1611–1616.
148. Huang Q, Liu B, Jiang R, Liao S, Wei Z, Bi Y, et al. G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells combined with platelet-rich plasma accelerate restoration of ovarian function in cyclophosphamide-induced POI rats. *Biol Reprod*. 2019;101(1):91–101.



8. ANEXOS

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I: Publicaciones y trabajos presentados a congresos de la estudiante pre-doctoral

8.1.1. Publicaciones científicas internacionales

8.1.1.1. *Publicaciones directamente relacionadas con la tesis doctoral*

- Herraiz S , Romeu M , Buigues A , Martínez S, Díaz-García C, Gómez- Seguí I, Martínez J, **Pellicer N**, Pellicer A. Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders. *Fertility and Sterility*. 2018 Aug;110(3):496-505.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.025.
- Herraiz S, **Pellicer N**, Romeu M, Pellicer A. Treatment potential of bone marrow-derived stem cells in women with diminished ovarian reserves and premature ovarian failure. *Current opinion in obstetrics and gynecology* 2019;31(3):156–62.
- **Pellicer N**, Herraiz S. New Concepts in Reproductive Medicine: Ovarian Rejuvenation. *IVI RMA Infertility & Assisted Conception Manual*. 2020. In press

8.1.1.2. *Publicaciones no directamente relacionadas con la tesis doctoral*

- Buigues A , Ferrero H , Martínez J, **Pellicer N**, Pellicer A, Gómez R. “Evaluation of PAI-1 in endometriosis using a homologous immunocompetent mouse model. *Biology of Reproduction*. 2018;99(2):326-335.
- Mas A, Alonso R, Garrido-Gómez T, Escorcía P, Montero B, Jiménez-Almazán J, Martín J, **Pellicer N**, Monleón J, Simón C. The differential diagnoses of uterine leiomyomas and leiomyosarcomas using DNA

and RNA sequencing. *Am J Obstet Gynecol.* 2019;221(4):320.e1-320.e23.

- Molina I, Mari M, Martínez JV, Novella-Maestre E, **Pellicer N**, Pemán J. Bacterial and fungal contamination risks in human oocyte and embryo cryopreservation: open versus closed vitrification systems. *Fertil Steril.* 2016;106(1):127-132.
- Molina I, Gómez J, Balasch S, **Pellicer N**, Novella-Maestre E. Osmotic-shock produced by vitrification solutions improves immature human oocytes in vitro maturation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;11;14(1):27.
- Ferrero H, García-Pascual CM, **Pellicer N**, Simón C, Pellicer A, Gómez R. Dopamine agonist inhibits vascular endothelial growth factor protein production and secretion in granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;17;13:104.
- Rodríguez-Iglesias B, Novella-Maestre E, Herraiz S, Díaz-García C, **Pellicer N**, Pellicer A. New methods to improve the safety assessment of cryopreserved ovarian tissue for fertility preservation in breast cancer patients. *Fertil Steril.* 2015;104(6):1493-502.e1-2.
- **Pellicer N**, Galliano D. Pellicer A. Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *The Ovary, Third Edition*, edited by Peter Leung and Eli Adashi. pp. 345 - 357. Elsevier, 07/11/2018. Tipo de producción: Capítulo de libro
- **Pellicer N**, Domingo S. Fertility preservation in gynecological cancers: cervix, endometrium, and ovary. *Cuadernos de Medicina Reproductiva.* Junio 2019. Tipo de producción: Capítulo de libro
- **Pellicer N**, Troncoso C. Ovarian hiperestimulation syndrome. *IVI RMA Infertility & Assisted Conception Manual.* 2020. In press



8.1.2. Trabajos presentados a congresos nacionales e internacionales

8.1.2.1. Presentaciones Orales

- **Autologous stem cell ovarian transplant (ASCOT), allowed 5 pregnancies in poor responder (PR)**
ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embriology)
City of event: Barcelona, Cataluña, Spain Date of event: 01/07/2018
End date: 04/07/2018
Nuria Pellicer; Sonia Herraiz; Monica Romeu; Susana Martinez;
Anna Buigues; Ines Gomez- Seguí; Antonio Pellicer.

- **Bone marrow derived stem cells restore ovarian function and fertility in women with POI: Interim report of a randomized trial comparing mobilization versus ovarian injection**ESHRE
(European Society of Human Reproduction and Embriology)
City of event: Copenhagen (due to SARS-CoV2), will be ONLINE
July 2020 (6th July)
Nuria Pellicer; Sonia Herraiz; Monica Romeu; Susana Martinez;
Anna Buigues; Ines Gomez- Seguí; Antonio Pellicer.

- **Identification of targetable mutations for differential molecular diagnosis of uterine leiomyomas versus leiomyosarcomas using next generation sequencing**
ASRM 2018
City of event: United States of America Date of event: 09/10/2018
Aymara Mas; Javier Jimenez Almazan; **Nuria Pellicer**; Javier Monleon; Carlos Simón.

- **Endometriosis' long term evolution**
XI CONGRESO DE LA SECCION DE ENDOSCOPIA
GINECOLÓGICA DE LA SEGO
City of event: Vigo, Galicia, Spain
Date of event: 14/06/2018 End date: 15/06/2018

Marta Tarazona; **Nuria Pellicer**; Alba Roca; Joana Dasi; Vicente Paya; Ernesto Bas.

- **Role and results of virtual colostomy in Deep endometriosis with intestinal resection**

Name of the conference: XI CONGRESO DE LA SECCION DE ENDOSCOPIA GINECOLÓGICA DE LA SEGO

City of event: vigo, Galicia, Spain

Date of event: 14/06/2018 End date: 15/06/2018

Ana Algaba; Carlos Sanchez; Marta Tarazona; **Nuria Pellicer**; Vicente Paya; Bas Flor.

- **Word's catheter as an alternative to Foley's catheter in Asherman's syndrome**

XI CONGRESO DE LA SECCION DE ENDOSCOPIA GINECOLÓGICA DE LA SEGO

City of event: Vigo, Galicia, Spain Date of event: 14/06/2018 End date: 15/06/2018

Organising entity: Sociedad española ginecologia y obstetricia

Nuria Pellicer; Antonio Pellicer; Jose Remohi; Jaime Ferro

- **Acortamiento cervical asintomático en gestaciones gemelares: pauta expectante vs. cerclaje**

30 Congreso Nacional de la Sección de Obstétrico-Ginecológca

Ciudad de celebración: Toledo, Castilla-La Mancha, España Fecha de celebración: 04/10/2018 Fecha de finalización: 06/10/2018

Entidad organizadora: SEGO

Nuria Pellicer De Castellví; Sheila Vazquez Rodriguez; Coral Lara Rodriguez; Jaime Ferro Camargo; Vicente Diago Almela; Alfredo Perales Marin; Vicente Serra Serra.

8.1.2.2. Posters

- ***Autologous stem cell ovarian transplantation (ASCOT) revitalized the aged blood-borne secretome in Poor responder (PR) women.***
ASRM 2019 Corresponding author: Yes
Philadelphia, United States of America. Date of event: 13/10/2019 End date: 16/10/2019: American Society of Reproductive Medicine
Nuria Pellicer; Anna Buigues; Francisco Dominguez; Susana Martinez; Antonio Pellicer; Sonia Herraiz.

- ***Evaluation of the efficiency of controlled ovarian stimulation by FORT in patients classified according to POSEIDON Group criteria***
8th International IVIRMA Congress, Corresponding author: Yes
Palma de Mallorca, Balearic Islands, Spain Date of event: 04/04/2019 End date: 06/04/2019
Raquel Garrido; Sheila Vazquez; Julia Escrig; **Nuria Pellicer**; Manuel Duarte; Roser Taroncher; Jose María Rubio Rubio.

- ***Evaluation of the efficiency of controlled ovarian stimulation by FORT in patients classified according to POSEIDON Group criteria with low reserve.***
8th International IVIRMA Congress, Corresponding author: Yes
Palma de Mallorca, Balearic Islands, Spain Date of event: 04/04/2019 End date: 06/04/2019
Sheila Vazquez; Raquel Garrido; **Nuria Pellicer**; Julia Escrig; Mael Duarte; Roser Taroncher; Jose María Rubio Rubio.

- ***Ovarian reserve optimization in poor ovarian responders (POR) after autologous stem cell transplant***
CROG Controversias en Reproducción, Obstetricia y Ginecología.
Valencia, Valencian Community, Spain
Date of event: 07/03/2018 End date: 07/03/2018
Valencia, Valencian Community, Spain
Nuria Pellicer de Castellvi; Mónica Romeu; Susana Martínez; Pilar

Solves; Inés Gómez; Jose Martínez; Anna Buigues; César Díaz García; Antonio Pellicer; Sonia Herráiz.

- ***Anatomopathological analysis of ovarian cortex metastasis in a large cohort of patient undergoing fertility preservation through ovarian cortex cryopreservation***

Name of the conference: ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology)

City of event: Ginebra, Switzerland

Date of event: 02/07/2017 End date: 05/07/2017

ESHRE

Ginebra,

Nuria García Camuñas; **Nuria Pellicer de Castellví**; Sheila Vázquez; Jessica Subirá; García Bella; M Andrés; Sonia Herráiz; Antonio Pellicer Martínez; César Díaz García.

- **Caso Clínico: Diagnóstico ecográfico intra-útero de la coartación de aorta abdominal**

30 CONGRESO NACIONAL DE LA SECCION DE ECOGRAFÍA OBSTÉTRICO-GINECOLÓGICA

Autor de correspondencia: Si

Ciudad de celebración: Toledo, Castilla-La Mancha, España Fecha de celebración: 04/10/2018 Fecha de finalización: 06/10/2018

Entidad organizadora: SEGO

Maria De Arriba García; **Nuria Pellicer de Castellví**; Gemma Perez; Rosa Gomez Portillo.

- **CHARACTERIZATION OF THE MOLECULAR PROFILE OF THE FOLLICULAR MILIEU IN POOR AND NORMO-RESPONDERS**

43rd International Dexeus Forum UPDATE IN OBSTETRICS, GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE MEDICINE

Barcelona, Catalonia, Spain

Date of event: 26/10/2016 End date: 28/10/2016

Barcelona, Catalonia, Spain

Nuria Pellicer de Castellvi, Raquel Garrido Casserras; César Díaz García;

- **NEUTROPHILS, DO THEY REALLY PLAY A ROLE IN OVULATION? A REVISITED QUESTION**

43rd International Dexeus Forum UPDATE IN OBSTETRICS, GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE MEDICINE

City of event: Barcelona, Catalonia, Spain

Date of event: 26/10/2016 End date: 28/10/2016

City organizing entity: Barcelona, Catalonia, Spain

Nuria Pellicer de Castellvi, Raquel Garrido Casserras, César Díaz García;

- **SUBOPTIMAL RESPONSE IN CONTROLLED OVARIAN STIMULATION (COS) IN YOUNG OOCYTE DONORS**

Name of the conference: 43rd International Dexeus Forum UPDATE IN OBSTETRICS, GYNECOLOGY AND REPRODUCTIVE MEDICINE

City of event: Barcelona, Catalonia, Spain

Date of event: 26/10/2016 End date: 28/10/2016

City organizing entity: Barcelona, Catalonia, Spain

Raquel Garrido Casserras; **Nuria Pellicer de Castellvi**, César Díaz García.

8.2. ANEXO II: Consentimientos informados

8.2.1. Consentimiento informado en ASCOT-1 para pacientes POR



MODELO DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: “Trasplante autólogo de médula ósea para rejuvenecimiento del nicho ovárico y favorecimiento de la formación de folículos ováricos en mujeres con baja reserva ovárica. Estudio piloto.”

Yo, *(nombre y apellidos)*.

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: *(nombre del Investigador)*

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del Participante

Firma del Investigador

Nombre:

Fecha:

Nombre:

Fecha:



8.2.2. Consentimiento informado en ASCOT-2 para pacientes POI



MODELO DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: “Autotrasplante ovárico de precursores hematopoyéticos derivados de médula ósea para recuperación del nicho y la función ovárica en pacientes con fallo ovárico precoz. Ampliación estudio piloto.”

Yo, *(nombre y apellidos)*.

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: *(nombre del Investigador)*

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del Participante

Firma del Investigador

Nombre:

Fecha:

Nombre:

Fecha:

8.3. ANEXO III: Hoja de información al paciente

8.3.1. Hoja de información al paciente en ASCOT-1 para pacientes POR



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

| | |
|---|--|
| <p>Versión de la HIP: Neofol</p> | <p>Fecha de la versión: 08/04/2014</p> |
| <p>Investigador Principal: Antonio Pellicer Martínez Jefe del Área de Salud de la Mujer 961245838</p> | |
| <p>CENTRO: Hospital Universitario y Politécnico La Fe</p> | |
| <p>Título del proyecto de investigación: "Trasplante autólogo de médula ósea para rejuvenecimiento del nicho ovárico y favorecimiento de la formación de folículos ováricos en mujeres con baja reserva ovárica. Estudio piloto."</p> | |

- **INTRODUCCIÓN:**

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico la Fe.

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportunas.

- **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que

por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

- **DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:**

Cambios en las tendencias sociales hacen que las mujeres retrasen la maternidad. Consecuencia de ello es la disminución de la calidad y la cantidad de óvulos disponibles. Estas bajas respondedoras representan el 9-18% de todas las pacientes que consultan en centros de reproducción. Han sido desarrollados numerosas pautas de estimulación ovárica, pero el número final de óvulos recuperados depende de los que quedan en los ovarios ya que no se generan de novo.

El propósito de la presente investigación es aumentar la reserva de óvulos de mujeres con baja reserva utilizando la capacidad de la médula ósea de regeneración celular. La médula ósea contiene células madre que pueden de algún modo favorecer la presencia de óvulos. De hecho, nuestro grupo está investigando regenerar el endometrio de mujeres con atrofia endometrial del mismo modo con buenos resultados.

Serán incluidas en este estudio un total de 20 pacientes que consulten por esterilidad y que hayan tenido, o se espere que vayan a tener, una baja respuesta a la estimulación por baja reserva de óvulos en los ovarios. Las pacientes deberán aceptar voluntariamente participar en este estudio y firmar este documento para poder ser incluidas en él.

Las células de la médula ósea serán obtenidas igual que se obtienen para los trasplantes. En todas las pacientes se realizará extracción de sangre para las descartar infecciones. También se determinará hemograma, bioquímica básica, hemoglobina, coagulación, test de embarazo, grupo sanguíneo y Rh. Si no se observan contraindicaciones se iniciará el tratamiento para movilización de células progenitoras en sangre periférica (CPSP) en la fase lútea (2ª mitad del ciclo menstrual) inicial del ciclo menstrual. El tratamiento de movilización consistirá en inyección subcutánea diaria de 10µg/kg de G-CSF (factor de crecimiento que estimula la médula ósea) durante 4 días dividida en dos dosis diarias.

Para la recolección de las CPSP se utilizarán los procedimientos estandarizados de la Unidad de Aféresis y Terapia Celular. El procedimiento de aféresis consiste en conectar por vía venosa (1-2 accesos) al donante o al paciente a una máquina separadora de células, mediante un equipo de bolsas y tubos de recolección estériles. La sangre llega al separador celular, donde se procesa y se selecciona el producto a recolectar, el resto de la sangre es devuelta al paciente o donante. Según el tipo de máquina de recolección y el producto que se pretende obtener la aféresis puede durar entre 30 minutos y 2 horas.

Los criterios de selección del donante son los mismos establecidos para la donación de sangre. Este procedimiento se realiza bajo la supervisión de personal médico y de enfermería con experiencia en este tipo de donación. Periódicamente se realizan una serie de controles de la donación como pulso, tensión, estado general del donante o paciente.

La infusión de las células obtenidas se realizará a nivel de los ovarios mediante angiografía (técnica de imagen que permite dibujar el árbol vascular). En cada paciente, las CPSP se dejarán en un solo ovario, mientras que el otro servirá como control. Se elegirá el ovario buscando las posibles ventajas anatómicas al seleccionar uno en particular en el momento de inclusión de la paciente en el estudio. Se realiza en la sala de angiografía digital usando la técnica específica para acceder a la arteria femoral y a través del mismo se procederá a cateterizar la arteria ovárica. A través del catéter se llega hasta el punto final seleccionado, donde se liberarán las CPSP en una suspensión de suero fisiológico.

Posteriormente, se realizará una determinación en suero de hormona antimulleriana (AMH) y recuento de folículos antrales (RFA) cada 2 días durante 2 semanas; a continuación 1 vez a la semana durante 4 semanas y finalmente de forma mensual hasta 5 meses. Se realizará un recuento de folículos antrales tras cada menstruación (día 2º-3º) durante el mismo período de seguimiento (5 meses).

En pacientes con AMH sérica y RFA con cambios significativos de aumento de reserva folicular se realizará una estimulación ovárica controlada (EOC) y una captación ovocitaria.

La estimulación ovárica controlada, la monitorización del crecimiento folicular

y la punción ovárica para captación de ovocitos se realizará de acuerdo con los protocolos habituales de la Unidad de Reproducción del Servicio de Ginecología, Área de Salud de la Mujer.

- **BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:**

La baja reserva ovárica es hoy por hoy un problema sin solución y la alternativa última para estas pacientes es la donación de ovocitos. Ha sido descrito y comprobado en animales que la médula ósea tiene células progenitoras capaces de restablecer la reserva ovárica. El mecanismo por el cual lo consigue es aún desconocido y está siendo investigado. Comprobar este efecto en el humano no sólo supone un gran avance científico sino que, por encima de todo, ofrece una opción a las mujeres con este problema de falta de óvulos. Una vez se compruebe se abre una vía de tratamiento que posibilita que las mujeres con baja reserva, a quien hoy sólo se puede ofrecer unos óvulos donados, puedan utilizar los suyos propios. Sin embargo, de no ser así, haber participado en este estudio no le habrá aportado beneficio alguno.

Los fármacos empleados tanto para la movilización de las células madre de la médula ósea como para la estimulación ovárica son fármacos de uso habitual en nuestras unidades y ya comercializados. No están exentos de riesgos pero estos son muy infrecuentes. De hecho el síndrome de hiperestimulación ovárica aparece precisamente en caso contrario al que nos ocupa ya que se da cuando en los ovarios hay gran cantidad de óvulos y se produce una respuesta exagerada con desarrollo de muchos folículos.

Durante las aféresis los efectos secundarios más frecuentes son los calambres musculares, que se solucionan con cierta facilidad suministrando calcio. Otros efectos secundarios de muy baja frecuencia son: hipotensión debido a la circulación extracorpórea, malestar general o síncope.

Las venopunciones no están exentas de riesgos ya que siempre podrían infectarse o producirse hematomas pero es poco frecuente y en todo caso no grave.

La cateterización de la femoral para llegar a la ovárica y liberar allí las células precursoras también podría complicarse con infección o sangrado pero es una



técnica en la que el Servicio de Radiología Intervencionista tiene manejo habitual para múltiples aplicaciones.

- **TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS:**

Desgraciadamente la baja respuesta carece de tratamiento. Han sido desarrollados diferentes protocolos de estimulación ovárica para tratar de obtener el máximo número de óvulos pero ninguno es realmente efectivo. Finalmente lo que se recomienda a estas pacientes es la donación de óvulos; técnica que no siempre es aceptada por las pacientes y/o sus parejas.

- **Nº DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO:**

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con las médicos del estudio Dras. Susana Martínez Cuenca o Mónica Romeu Villarroya en el número de teléfono 961244114 ó 961244115 ó 669928313

- **CONFIDENCIALIDAD:**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes, se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio o colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal. El responsable del Registro

de los datos en la Agencia Española de Protección de Datos, es la Consellería de Sanitat.

Sólo se tramitarán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc... En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio, colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente. El acceso a su historia clínica ha de ser sólo en lo relativo al estudio.

- **COMPENSACIÓN ECONÓMICA:**

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que su participación en este no le supondrá ningún gasto.

- **OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:**

Cualquier nueva información referente a los fármacos utilizados en el estudio que se descubra durante su participación y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente obtenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del mismo lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la mediación en estudio o porque consideren que usted no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo por el que se ha decidido su retirada del estudio.

El promotor podrá suspender el estudio siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en la legislación vigente.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad, pero es posible que no se le pueda seguir administrando la medicación objeto del presente estudio. Por lo tanto, ni el investigador, ni el promotor, adquieren compromiso alguno de mantener dicho tratamiento fuera de este estudio.



8.3.2. Hoja de información al paciente en ASCOT-2 para pacientes POI



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

| | |
|--|--|
| <p>Versión de la HIP: 2</p> | <p>Fecha de la versión 2: 27/07/2017</p> |
| <p>Investigador Principal: Antonio Pellicer Martínez, Grupo investigación Medicina Reproductiva. Servicio de Ginecología. Teléfono: 961245838-</p> | |
| <p>CENTRO: HUP LA FE</p> | |
| <p>Título del proyecto de investigación: "Autotrasplante ovárico de precursores hematopoyéticos derivados de médula ósea para recuperación del nicho y la función ovárica en pacientes con fallo ovárico precoz. Ampliación estudio piloto."</p> | |

- **INTRODUCCIÓN:**

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico la Fe.

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportunas.

- **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

- **DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:**

El Fallo Ovárico Precoz (FOP) se caracteriza por la pérdida de la actividad de los ovarios, y consiguiente aparición de la menopausia, de forma prematura (antes de los 40). Afecta al 1% de las mujeres y puede ser causada por defectos genéticos y cromosómicos, patología autoinmune, radio- y quimioterapia, infecciones, cirugía o por causas desconocidas. Las pacientes con FOP presentan tasas de gestación mucho más bajas en comparación con las “normorespondedoras” y a pesar de que se han valorado múltiples estrategias terapéuticas, hasta el momento la única solución práctica para estas pacientes es la donación de ovocitos, puesto que las alternativas son renunciar a la maternidad o aceptar la donación.

El objetivo de este estudio es investigar una estrategia que podría permitir a estas pacientes conseguir su deseada maternidad a pesar de que sus ovarios hayan dejado de funcionar. Consiste en aprovechar la capacidad regeneradora de las células madre de la médula ósea. Estas células madre podrían de algún modo tener efectos positivos sobre el ovario, favoreciendo el crecimiento de folículos remanentes que en circunstancias normales estarían “dormidos”. De hecho, nuestro grupo está investigando los efectos de dichas células sobre el potencial reproductivo de otro tipo de pacientes (bajas respondedoras), habiendo obtenido resultados muy prometedores hasta el momento.

En este estudio participarán un total de 20 pacientes que presenten FOP. Cada paciente deberá aceptar voluntariamente participar en este estudio y firmar este documento para poder ser incluida en él. Las pacientes serán asignadas de forma aleatoria al grupo experimental 1 (movilización células desde médula ósea) o al grupo experimental 2 (movilización células desde MO e infusión en



ovario).

Las células madre de la médula ósea se obtendrán siguiendo el mismo protocolo que se aplica para los trasplantes. Antes de ello, a las pacientes se les realizará una extracción de sangre para descartar infecciones y determinar hemograma, bioquímica básica, hemoglobina, coagulación, test de embarazo, grupo sanguíneo y Rh. Si no se observan contraindicaciones, se iniciará el tratamiento para movilizar las células madre residentes en la médula ósea a sangre periférica. El tratamiento de movilización consistirá en inyección subcutánea diaria de 10µg/kg de G-CSF (factor de crecimiento que estimula la médula ósea) durante 4-5 días dividida en dos dosis diarias.

Para la recolección de las células madre de la médula ósea en sangre periférica se utilizarán los procedimientos estandarizados de la Unidad de Aféresis y Terapia Celular. El procedimiento de aféresis consistirá en conectar por vía venosa (1-2 accesos) al paciente a una máquina separadora de células, mediante un equipo de bolsas y tubos de recolección estériles. La sangre llega al separador celular, donde se procesa y se selecciona el producto a recolectar, devolviéndose el resto de la sangre al paciente. Según el tipo de máquina de recolección y el producto que se pretende obtener la aféresis podrá durar entre 30 minutos y 2 horas. Este procedimiento se realizará bajo la supervisión de personal médico y de enfermería con experiencia en este tipo práctica clínica. Se reservará una alícuota de 1-2ml para su análisis y estudio experimental.

La infusión de las células obtenidas se realizará a nivel de los ovarios mediante angiografía (técnica de imagen que permite dibujar el árbol vascular). En cada paciente, las células madre se dejarán en un solo ovario, mientras que el otro servirá como control.

Posteriormente, se registrará si existe recuperación de la menstruación y se determinarán los niveles en suero de FSH, E2 y AMH, así como el RFA mediante ecografía. Estas determinaciones se realizarán una vez a la semana durante los primeros 15 días y de forma bisemanal hasta el final del período de seguimiento (6 meses).

En aquellas pacientes que se detecten cambios favorables en el perfil hormonal y el RFA (≥ 1 foll.) se realizará una estimulación ovárica controlada (EOC) y una captación ovocitaria. La estimulación ovárica controlada, la monitorización del crecimiento folicular y la punción ovárica para captación de óvulos se realizará de acuerdo con los protocolos habituales de la Unidad de Reproducción del Servicio de Ginecología, Área de Salud de la Mujer.

Los resultados obtenidos en las pacientes que reciban el tratamiento (grupo experimental 2) descrito serán comparados con los de pacientes del brazo experimental 1 (pacientes con FOP a las que se les movilizarán las células madre de la médula ósea a sangre periférica pero no se les recolectaran ni se les dejarán en el ovario). Si usted acepta participar en el estudio puede ser asignada al grupo experimental 1 o grupo experimental 2.. Esta asignación se realiza de forma aleatoria, sin posibilidad de elección, ni por su parte ni por parte del investigador.

- **BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:**

Desgraciadamente a día de hoy la única solución práctica para pacientes con FOP es la donación de ovocitos. Ha sido descrito y comprobado en animales que la médula ósea tiene células madre capaces de restablecer la reserva ovárica. El mecanismo por el cual lo consigue es aún desconocido y está siendo investigado. Comprobar este efecto en el humano no sólo supone un gran avance científico sino que, por encima de todo, ofrece una opción a las mujeres con este problema. Una vez se compruebe se abre una vía de tratamiento que posibilita que las mujeres con FOP, a quien hoy sólo se les puede ofrecer unos óvulos donados para conseguir ser madres, puedan utilizar sus propios óvulos. Sin embargo, de no ser así, haber participado en este estudio no le habrá aportado beneficio alguno.

Los fármacos empleados tanto para la movilización de las células madre de la médula ósea como para la estimulación ovárica son fármacos de uso habitual en nuestras unidades y ya comercializados. No están exentos de riesgos pero estos son muy infrecuentes. De hecho el síndrome de hiperestimulación ovárica

aparece precisamente en caso contrario al que nos ocupa ya que se da cuando en los ovarios hay gran cantidad de óvulos y se produce una respuesta exagerada con desarrollo de muchos folículos.

Durante las aféresis los efectos secundarios más frecuentes son los calambres musculares, que se solucionan con cierta facilidad suministrando calcio. Otros efectos secundarios de muy baja frecuencia son: hipotensión debido a la circulación extracorpórea, malestar general o síncope.

Las venopunciones no están exentas de riesgos ya que siempre podrían infectarse o producirse hematomas pero es poco frecuente y en todo caso no grave.

La cateterización de la femoral para llegar a la ovárica y liberar allí las células precursoras también podría complicarse con infección o sangrado pero es una técnica en la que el Servicio de Radiología Intervencionista tiene manejo habitual para múltiples aplicaciones.

- **TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS**

A día de hoy no existen tratamientos alternativos.

- **Nº DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO:**

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con los médicos del estudio Dras. Susana Martínez Cuenca o Mónica Romeu Villarroya en el número de teléfono 961244114 ó 961244115 ó 669928313.

- **CONFIDENCIALIDAD**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes, se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los

derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio o colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El responsable del registro será la Consellería Sanidad.

Sólo se tramitarán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc... En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio, colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente. El acceso a su historia clínica ha de ser sólo en lo relativo al estudio.

El garante de la confidencialidad de los datos recogidos para el estudio, y responsable de la base de datos del mismo es el Dr. Pellicer.

- **COMPENSACIÓN ECONÓMICA:**

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que su participación en éste no le supondrá ningún gasto. El presente estudio se trata de un estudio sin ánimo de lucro, con una base académica, por lo tanto los investigadores implicados en el mismo no recibirán ninguna compensación en el mismo derivada de su participación ni de la inclusión de pacientes.



- **OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:**

Cualquier nueva información referente a la intervención realizada en el estudio que se descubra durante su participación y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente obtenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del mismo lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la mediación en estudio o porque consideren que usted no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo por el que se ha decidido su retirada del estudio.

El promotor podrá suspender el estudio siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en la legislación vigente.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad, pero es posible que no se le pueda seguir administrando la medicación objeto del presente estudio. Por lo tanto, ni el investigador, ni el promotor, adquieren compromiso alguno de mantener dicho tratamiento fuera de este estudio.

Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders

Sonia Herraiz, Ph.D.,^{a,b,c} Mónica Romeu, M.D.,^{c,d} Anna Buigues, B.Sc.,^{a,c,e} Susana Martínez, M.D.,^d César Díaz-García, M.D.,^f Inés Gómez-Seguí, M.D.,^g José Martínez, M.D.,^h Nuria Pellicer, M.D.,^d and Antonio Pellicer, M.D.^{a,c,i}

^a Fundación IVI, ^b IVI-RMA Valencia, ^c Reproductive Medicine Research Group, IIS La Fe, ^d Women's Health Area, ^e Hematology Department, and ^f Radiology Department, La Fe University Hospital; ^g Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Valencia, Spain; ^h IVI-RMA London, London, United Kingdom; and ⁱ IVI-RMA Rome, Rome, Italy

Objective: To evaluate effects of autologous stem cell ovarian transplant (ASCOT) on ovarian reserve and IVF outcomes of women who are poor responders with very poor prognosis.

Design: Prospective observational pilot study.

Setting: University hospital.

Patient(s): Seventeen women who are poor responders.

Intervention(s): Ovarian infusion of bone marrow-derived stem cells.

Main Outcome Measure(s): Serum antimüllerian hormone levels and antral follicular count (AFC), punctured follicles, and oocytes retrieved after stimulation (controlled ovarian stimulation) were measured. Apheresis was analyzed for growth factor concentrations.

Result(s): The ASCOT resulted in a significant improvement in AFC 2 weeks after treatment. With an increase in AFC of three or more follicles and/or two consecutive increases in antimüllerian hormone levels as success criteria, ovarian function improved in 81.3% of women. These positive effects were associated with the presence of fibroblast growth factor-2 and thrombospondin. During controlled ovarian stimulation, ASCOT increased the number of stimuable antral follicles and oocytes, but the embryo euploidy rate was low (16.1%). Five pregnancies were achieved: two after ET, three by natural conception.

Conclusion(s): Our results suggest that ASCOT optimized the mobilization and growth of existing follicles, possibly related to fibroblast growth factor-2 and thrombospondin-1 within apheresis. The ASCOT improved follicle and oocyte quantity enabling pregnancy in women who are poor responders previously limited to oocyte donation.

Clinical Trial Registration Number: NCT02240342. (Fertil Steril® 2018; ■:■-■. ©2018 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Poor responder, bone marrow-derived stem cell transplant, ovarian reserve, AMH, antral follicular count

Discuss: You can discuss this article with its authors and other readers at <https://www.fertstertdialog.com/users/16110-fertility-and-sterility/posts/32188-25000>

Up to 15% of couples trying to conceive are considered infertile and require medical assistance

to achieve pregnancy (1). The deleterious effects of aging on ovarian reserve and oocyte quality are well known (2). Aged

women with low ovarian reserve are typically referred to as poor responders and make up 9%–24% of patients seeking therapy at assisted reproductive technology (ART) clinics (3). Oocyte donation is the practical therapeutic option (4), but it involves significant psychological burdens (5) and encounters regulatory restrictions in many countries. Thus, interventions that support the regeneration of already aged or damaged gonads and rejuvenate the ovaries are constantly sought for patients who are poor responders.

Received September 13, 2017; revised March 10, 2018; accepted April 16, 2018.

S.H. has nothing to disclose. M.R. has nothing to disclose. A.B. has nothing to disclose. S.M. has nothing to disclose. C.D.-G. has nothing to disclose. I.G.-S. has nothing to disclose. J.M. has nothing to disclose. N.P. has nothing to disclose. A.P. has nothing to disclose.

Sonia Herraiz, Mónica Romeu, Anna Buigues, and Susana Martínez should be considered similar in author order.

Partially funded by a PROMETEOII/2014/045 grant of the Regional Valencian Ministry of Education and FIS P115/00312 and PTQ-16-08222 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

Reprint requests: Sonia Herraiz, Ph.D., Fundación IVI, Avenue Fernando Abril Martorell, 106 - Torre A 1^a, 46026 Valencia, Spain (E-mail: Sonia.Herraiz@ivi.es).

Fertility and Sterility® Vol. ■, No. ■, ■ 2018 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2018 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.025>

Attempts to overcome a poor response have been thus far focused on stimulating the ovaries to promote follicle growth. Many controlled ovarian stimulation (COS) protocols and other alternatives have been tested, but none have proven to be successful in the clinic (6), probably due to the low number of remaining antral, gonadotropin-dependent, stimulus-responsive follicles within the ovaries (7). Nevertheless, a small pool of quiescent primordial follicles remain, even in the ovaries of patients who are menopausal and have premature ovarian insufficiency (POI), which could potentially contribute to increase the final yield of oocytes. In fact, competent oocytes could be retrieved after the activation and growth of these remaining follicles by several approaches, providing them with an appropriate growth-supporting ovarian niche (8–10).

Bone marrow transplants in patients with POI due to chemotherapy or radiotherapy treatments rescues ovarian function as demonstrated by several spontaneous pregnancies (11–15). Although the molecular autocrine/paracrine mechanisms that control primordial follicle activation remain unknown, it is believed that the local environment (niche) plays a fundamental role. Several studies have used bone marrow-derived stem cells (BMDSC) to activate the niche. We recently described that BMDSC infusion promotes human and mouse follicular growth by increasing ovarian vascularization, stromal cell proliferation, and reducing cell death (16, 17). Furthermore, we have regenerated the endometrium in women with Asherman's syndrome after isolation and infusion of the bone marrow-CD133+ population (18).

Several mechanisms have been proposed to achieve tissue regeneration by adult stem cell therapy (19). In the context of ovarian tissue, paracrine actions should be evaluated for their ability to activate the preexisting quiescent follicles based on the ability of adult stem cells to produce and secrete a variety of cytokines, chemokines, and growth factors, which may be involved in tissue repair (19). Some of these soluble factors are known to be involved in follicular growth, stem cell signaling, angiogenesis, viability, and ovarian response to COS (20–22).

Based on this information, we designed a method to deliver BMDSC directly to human ovaries in an effort to induce ovarian rejuvenation in patients who are poor responders and optimize the recruitment of existing dormant follicles to improve IVF outcomes. The results begin to elucidate the underlying mechanisms of ovarian rejuvenation and point the way for the development of future ART therapies.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

This pilot study was designed for autologous stem cell ovarian transplantation (ASCOT) in 17 patients who are poor responders defined according to the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) criteria (23). All participants voluntarily accepted and signed the written consent form.

The study consisted of BMDSC mobilization to peripheral blood by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) treatment and subsequent collection by apheresis. Cells

were delivered into the ovarian artery by the intra-arterial catheter in one side. In each patient, the other ovary was used as a control. The main end points were clinical improvement of ovarian reserve as measured by antral follicle count (AFC) and serum antimüllerian hormone (AMH) levels, monitored up to 5 months after ASCOT, as well as the number of metaphase II (MII) oocytes retrieved after ovarian stimulation. Secondary outcome measures consisted of number of treatment cycles, cancellation rate, number of obtained embryos and euploid embryos assessed by comparative genomic hybridization array, cumulative pregnancy rate (PR), and cumulative live birth rate. Pregnancy could be achieved by fresh or cryo/thawed embryo transfer (ET). Spontaneous pregnancies were also considered.

The study was simultaneously set up to determine the mechanisms involved in a positive ovarian response. Concentrations in each apheresis sample of a number of growth factors released by BMDSC was evaluated and compared with ovarian reserve before and after the ASCOT procedure. The study design is summarized in [Supplemental Figure 1](#) (available online).

Bone Marrow Stem Cell Mobilization and Apheresis

An SC dose of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ of G-CSF was administered during 5 days. On the fifth day, stem cell collection was performed if patients reached a threshold of CD34+ circulating cells in peripheral blood ≥ 10 cells/ μL . Cell collection was performed using standard procedures, including continuous flow apheresis in an OPTIA cell separator (Caridian). The target was to reach a minimum of 4×10^6 CD34+ cells/kg.

Samples were immediately analyzed by flow cytometry after collection to quantify the CD133+ population. A volume of whole apheresis containing 50×10^6 CD133+ cells was then prepared for infusion.

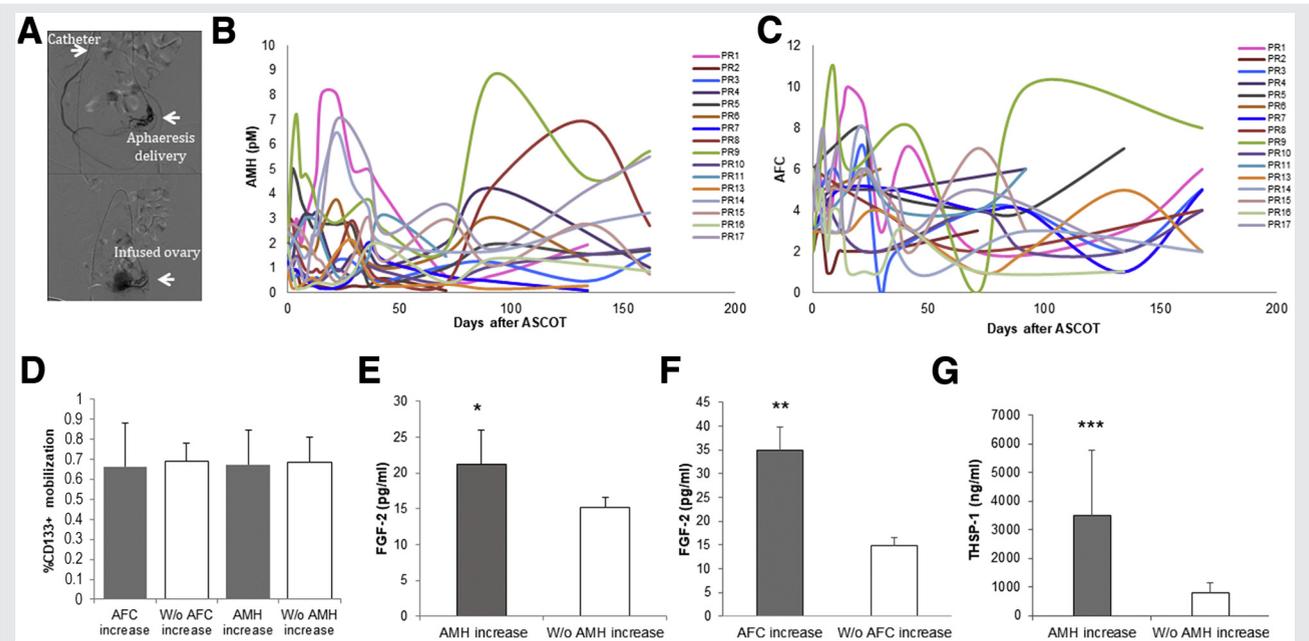
Intra-arterial Catheterization

Patients were referred to the Interventional Radiology Unit for delivery of the apheresis concentrates to the ovarian artery by intra-arterial catheterization. The time between cell collection and ASCOT was <24 hours in all cases. In each patient, ASCOT was randomly delivered in one ovary. In a digital angiography suite, using the Seldinger technique to approach the common femoral artery with an 4-F port, the ovarian artery was reached with a Cobra 2 catheter and a Terumo's 0.035-inch guide. Then, a 2.5-F microcatheter with a 0.014-inch guide was placed through the Cobra catheter to the opposite end, through which BMDSC were delivered ([Fig. 1A](#)).

Patient Follow-Up

The AFC by transvaginal ultrasound and serum AMH levels were considered markers of ovarian response to ASCOT (24). Both were recorded in all patients under basal conditions before G-CSF injection. After the ASCOT procedure, serum AMH and AFC were recorded every 2 days for 2 weeks, then once a week for 4 weeks, and then monthly up to 5 months. The criteria for a positive response by ovarian reserve to

FIGURE 1



Autologous stem cell ovarian transplant (ASCOT) procedure, follow-up, and composition. (A) Initial steps of the intra-arterial catheterization procedure showing aphaeresis (*black*) being delivered into the ovary. (B) Individual antimüllerian hormone (AMH) progress patterns were highly heterogeneous among patients. Patients 1, 4, 5, 9, 11, 14, and 17 showed an enhancement in AMH levels very early after treatment (<22 days), but no significant differences were detected in general. (C) Ovarian response was highly variable among patients, and no statistically significant differences were observed when total antral follicular count (AFC) results were analyzed. (D) The mobilization rate of CD133+ was not related to ovarian reserve optimization by ASCOT. (E) Fibroblast growth factor (FGF)-2 displayed a positive correlation with AMH and was more in the patients whose AMH improved (* $P=0.03$). (F) FGF-2 concentration was higher in patients in which the AFC increased (** $P=0.004$). (G) Higher thrombospondin 1 levels were found in patients whom AMH increased (** $P=0.049$).

Herraiz. Ovarian reserve after stem cell therapy. *Fertil Steril* 2018.

ASCOT were an increase in AFC to three or more follicles from basal measurements and/or an increase of two SD in AMH levels in two consecutive measurements compared with basal levels.

Ultrasound was performed by two operators (M.R. and S.M.) using a GE iVoluson (General Electric) equipped with a vaginal three-dimensional probe (6.5–9 MHz). Each follicle was counted independently, measuring its longitudinal and transverse axes. Antral follicles were defined as any anechoic image measuring between 2 and 10 mm within the ovarian parenchyma. The AFC value was recorded on each time-point for treated, control ovary, and total AFC (both ovaries).

Serum AMH was determined using the System Cobas Elecsys 2010 AMH ELISA assay (Roche Diagnostics). The limit of detection was 0.07 pmol/L and the interassay variation was 3.8% (1 ng/mL = 7.143 pmol/L).

COS, Intracytoplasmic Sperm Injection, and Genetic Screening Protocols

During the follow-up period of this observational study, patients were scheduled to undergo COS starting on the second menstrual cycle day when an AFC increase would be observed. However, this criterion was not always followed due to patients' or physicians' availability. The COS with human recombinant FSH was performed with

the same protocol used in their previous cycle before ASCOT. In most of the patients, 300 IU recombinant FSH (Gonal-F, Merck) plus 150 IU hMG (Menopur, Ferring) were administered daily. A GnRH antagonist (Cetrotide, Merck) was introduced when the leading follicle reached 13–14 mm or serum E_2 reached 400 pg/mL. Final oocyte maturation was triggered with hCG (Ovitrelle 250 mg, Merck) when leading follicles were ≥ 18 mm. Oocyte pick-up was performed 36 hours after hCG administration. Oocytes were denuded 2 hours after oocyte retrieval and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was then performed using fresh sperm. The COS was canceled if follicle development was not detected.

The obtained embryos were biopsied for preimplantation genetic screening by comparative genomic hybridization array (25) on day 3. Euploid embryos were then transferred under ultrasonographic control 5 days after pick-up. Luteal phase was supported by 400 mg/d vaginal P (Progeffik, Effik or Utrogestan, SEID) starting after oocyte retrieval.

Apheresis Characterization

Flow cytometry. Cells were analyzed in a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) by gating on CD133+ or CD133- populations (CD133-PE, Miltenyi Biotech) followed by subsequent evaluation of CD34 or CD45 expression

(CD34-APC and CD45-FITC, Becton Dickinson) on the viable CD133+ population. Nonviable cells expressing 7-amino-actinomycin D were excluded from analysis. Trucount beads were used to calculate absolute cell counts.

Quantification of secreted soluble growth factors in apheresis. The concentrations of fibroblast growth factor (FGF)-2, platelet-derived growth factor (PDGF)-BB, thrombospondin (THSP)-1, and insulin-like growth factor (IGF)-1, all soluble factors secreted by circulating BMDSC, were quantified by ELISA and multiplex ELISA in plasma samples. Plasma was obtained after centrifugation of apheresis samples into an ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated tube for 10 minutes at $1,000 \times g$ at 4°C .

The FGF-2 and PDGF-BB titers were determined by using the ProcartaPlex Human FGF-2 and PDGF-BB Simplex kits (Affymetrix eBioscience, LabClinics S.A.) following the manufacturer's protocol. The lower limit of quantification for FGF-2 and PDGF-BB was 4.90 pg/mL and 7.32 pg/mL, respectively.

The Human Thrombospondin-1 Quantikine ELISA and Human IGF-I Quantikine ELISA kits (R&D Systems Europe) were used to quantify THSP-1 and IGF, following the manufacturer's protocols. The limit of detection was 0.35 ng/mL for THSP-1 and 0.026 ng/mL for IGF-1. The intra-assay and inter-assay variations were 6.4% and 5.9% for the THSP-1 and 4.0% and 8.0% for the IGF-1 assay.

Statistical Analysis

All data are presented as arithmetic mean \pm SD or median and interquartile range. Two-by-two comparisons using the Mann-Whitney's *U* test were used to evaluate the results between groups. The Wilcoxon signed rank test was used to compare the clustered-paired IVF outcomes before and after ASCOT for each patient. The correlation between variables

was established by using the Spearman's correlation. Values of $P < .05$ were considered statistically significant. For multiple comparisons, a Bonferroni multiple test correction was applied; therefore, $P < .0127$ was considered as statistically significant. All the analyses were performed using SPSS 22.0 (IBM).

RESULTS

ASCOT Technique

All patients reached the threshold of 4×10^6 CD34+ cells/kg after G-CSF treatment. Mobilization increased the BMDSC population to $\geq 10,000$ CD34+ cells/mL in peripheral blood. Apheresis and ASCOT were successfully developed (Fig. 1A) in all cases, except for one in whom infusion was stopped due to a venous spasm and therefore was withdrawn from the study (P12). Another patient presented with headache during the G-CSF treatment, which was resolved with paracetamol. Data regarding stem cell collection, apheresis concentration, infused volume, and CD34+ and CD133+ populations in apheresis are presented in Supplemental Table 1 (available online).

Ovarian Reserve

The total AFC increased, compared with baseline, from day 2–day 43 after ASCOT. This increase was statistically significant on day 15 ($P = .031$) (Table 1). No difference was detected when the treated ovary was compared with the control ovary at any other analyzed time-point.

The serum AMH profile is also shown in Table 1. No differences were observed when all cases were analyzed together ($P = .14$), but individual variations were seen (Fig. 1B), indicating that some patients displayed a remarkable increase in serum AMH during the first 4 weeks of follow-up.

Because we observed that some patients had a response to treatment (Fig. 1B and 1C), we arbitrarily considered a

TABLE 1

Antimüllerian hormone (AMH) and antral follicular count (AFC) values.

| Day after ASCOT | AMH (pM) | Total AFC | AFC control ovary | AFC infused ovary |
|-----------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|
| Baseline | 1.9 \pm 0.6 (2.0) | 4.0 \pm 1.3 (4.0) | 1.9 \pm 0.8 (2.0) | 2.2 \pm 1.0 (2.0) |
| Day (D)+2 | 2.2 \pm 1.7 (2.0) | 4.6 \pm 1.3 (4.0) | 2.4 \pm 1.7 (2.0) | 2.2 \pm 0.8 (2.0) |
| D+4 | 2.1 \pm 1.8 (2.0) | 4.9 \pm 1.7 (5.0) | 2.1 \pm 1.2 (2.0) | 2.7 \pm 1.4 (2.0) |
| D+6 | 1.7 \pm 1.4 (1.4) | 3.0 \pm 1.4 (3.0) | 1.7 \pm 1.4 (1.5) | 1.3 \pm 1.0 (1.0) |
| D+8 | 1.7 \pm 1.5 (0.9) | 5.2 \pm 2.7 (5.0) | 2.7 \pm 1.8 (2.0) | 2.5 \pm 1.6 (2.5) |
| D+11 | 1.8 \pm 1.4 (1.6) | 4.9 \pm 2.1 (5.0) | 2.3 \pm 1.5 (2.0) | 2.6 \pm 1.1 (2.0) |
| D+13 | 1.9 \pm 1.5 (1.9) | 4.7 \pm 2.4 (4.5) | 2.0 \pm 2.1 (1.5) | 2.7 \pm 1.2 (2.5) |
| D+15 | 2.1 \pm 2.1 (1.7) | 4.9 \pm 2.2 (5.0) ^a | 2.1 \pm 1.7 (2.0) | 2.7 \pm 1.5 (2.5) |
| D+22 | 2.4 \pm 2.6 (1.4) | 6.0 \pm 2.7 (6.5) | 2.6 \pm 2.1 (2.0) | 3.3 \pm 1.5 (3.5) |
| D+29 | 1.9 \pm 1.4 (1.6) | 3.9 \pm 1.8 (4.5) | 1.8 \pm 1.1 (2.0) | 2.0 \pm 1.4 (1.5) |
| D+36 | 2.0 \pm 1.6 (1.6) | 4.3 \pm 1.3 (4.5) | 2.4 \pm 1.3 (2.0) | 1.8 \pm 0.8 (2.0) |
| D+43 | 1.5 \pm 1.1 (1.2) | 4.0 \pm 2.8 (3.0) | 2.0 \pm 1.7 (1.5) | 2.0 \pm 1.4 (2.0) |
| D+71 | 1.0 \pm 0.7 (0.8) | 3.4 \pm 1.7 (4.0) | 1.7 \pm 1.0 (2.0) | 1.8 \pm 1.0 (2.0) |
| D+92 | 2.5 \pm 2.5 (1.6) | 4.4 \pm 2.4 (4.0) | 2.1 \pm 1.5 (2.0) | 2.3 \pm 1.4 (2.0) |
| D+134 | 2.2 \pm 2.6 (1.3) | 3.3 \pm 2.3 (2.5) | 1.2 \pm 0.8 (1.0) | 2.2 \pm 1.7 (2.0) |
| D+162 | 2.4 \pm 1.7 (1.8) | 4.9 \pm 1.9 (5.0) | 2.2 \pm 1.5 (1.5) | 2.6 \pm 1.3 (2.0) |

Note: mean \pm SD (median). Statistically significant differences were observed in the AFC on D15 compared with basal levels ($P = .031$). No significant differences were detected between control and infused ovaries. ASCOT = autologous stem cell ovarian transplant.

Herraiz. Ovarian reserve after stem cell therapy. *Fertil Steril* 2018.

positive response when women displayed an increase in total AFC of three or more follicles after ASCOT and/or showed two consecutive increases (+2 SD) in AMH level. Using these criteria, the ovarian reserve improved in 13 of the 16 patients (81.3%). Both criteria were accomplished in only six (37.5%) of the patients; in the remainder, two (12.5%) achieved only the AFC increase and five displayed (31.3%) only AMH improvement. All of these AFC and AMH increases were detected during the first 4 weeks of follow-up, although several patients also displayed a second increase after this initial period (Fig. 1B,C). A comparison of the injected ovaries with the control ovaries showed that the number of antral follicles did not change when the entire population was analyzed (Table 1).

Graft Cellular Composition and ASCOT Success

To evaluate the influence of different BMDSC populations in the engraftment capability and ASCOT success, all samples were analyzed for several hematopoietic stem cell surface markers. We found that within the viable CD133+ population, 97.9% ± 1.4% of cells also expressed the endothelial marker CD34, whereas the most stem cell-like cells, those that were CD133+CD34-, only represented 2.1% ± 1.4% of the CD133+ subset. The coexpression of the leukocyte common antigen CD45+ was expressed on 98.2% ± 1.5% of the CD133+ cells, with a lower signal, highlighting the fact that although they were monocyte cells, our BMDSC popula-

tion was not differentiated to leukocytes. Only 1.7% ± 1.2% of CD133+ cells could be classified as leukocytes based on their strong expression of CD45++, whereas the remaining 0.1% ± 0.4% was negative for CD45.

Comparison of cell populations and outcomes were performed. No association was observed between the total amount of viable CD133+ cells mobilized by patient and ASCOT outcomes (Fig. 1D).

Secreted Soluble Growth Factors

The concentration of select soluble factors was determined in patients with or without improvement of ovarian reserve parameters after ASCOT (Supplemental Table 2, available online). Women with a positive response in terms of AFC ($P=.04$) and AMH ($P=.03$) had higher FGF-2 values than those without a positive response (see Fig. 1F and 1E, respectively). The THSP-1 concentration was found to have a positive correlation with enhancement in AFC ($r = 0.98$, $P < .01$), and a significantly increased concentration was found in patients for whom serum AMH improved ($P=.049$) (Fig. 1G). When IGF-1 and PDGF-BB were analyzed, no statistically significant correlation was detected with the outcomes of the study.

IVF and Reproductive Outcomes

Before recruitment for this study, our 15 poor responders started a total of 24 COS and their reproductive outcomes

TABLE 2

| Patient characteristics. | | | | |
|--------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------|---------|
| Parameter | Previous (n = 24) | After ASCOT (all, n = 28) | After ASCOT optimal (n = 4) | P value |
| Patient age (y) | 36 (34–37) | 38 (36–38) | 34 (33–37) | < .001 |
| Partner age (y) | 36 (35–40) | 37 (36–44) | 35 (34–38) | < .001 |
| Years of infertility | 3 (2–4) | 4 (3–5) | 3 (2–3) | < .001 |
| COS cycles (n) | 2.0 (1–2) | 2 (2–3) | 2 (1–2) | NS |
| 1 | 7 | 5 | 1 | |
| 2 | 7 | 7 | 3 | |
| ≥3 | 1 | 3 | 0 | |
| BMI (%) | 24 (23–25) | 24 (21–25) | 24 (18–25) | NS |
| FSH (IU/mL) | 10.1 (9.3–14.5) | 12.3 (9.7–21.5) | | NS |
| AMH (pM) | 1.0 (0.9–3.0) | 2.8 (0.7–3.7) | 2.9 (2.3–4.1) | < .001 |
| Days of stimulation | 10 (9–12) | 9 (7–11) | 9 (9–12) | NS |
| Gonadotrophin dose | 3,937 (2,475–4,950) | 4,050 (3,150–4,612) | 4,100 (4,050–4,950) | NS |
| E ₂ hGC day | 500 (385–1,296) | 585 (386–775) | 661 (253–1,416) | NS |
| AFC total | 3 (0–5) | 5 (4–6) | 8 (7–9) | .0008 |
| Control ovary | 2 (2–3) | 3 (2–3) | 5 (4–5) | NS |
| Infused ovary | 2 (1–3) | 2 (1–3) | 3 (2–3) | .02 |
| Punctured follicles | 3 (1–6) | 3 (1–4) | 3 (2–4) | .035 |
| Control ovary | 0 (0–1) | 2 (0–2) | 2 (2–2) | NS |
| Infused ovary | 0 (0–1) | 1 (0–2) | 1 (0–2) | NS |
| MII oocytes | 2 (0–3) | 2 (1–3) | 2.5 (1–4) | NS |
| Control ovary | 0 (0–1.2) | 1 (0–1) | 1 (1–2) | |
| Infused ovary | 0 (0–0.2) | 1 (0–2) | 0.5 (0–1) | |
| Embryos | 1 (0–2) | 1 (1–2) | 1 (0–4) | NS |
| Control ovary | 0 (0–0.5) | 0 (0–1) | 0.5 (0–2) | |
| Infused ovary | 0 (0–0) | 1 (0–1) | 0.5 (0–1) | |
| Cancellation | 7/24 (29.2%) | 4/28 (14.2%) | 0/4 (0) | < .001 |

Note: Values are shown as median (interquartile range) or number (%). Wilcoxon nonparametric paired test was applied to compare previous, optimal, and after ASCOT COS for each patient. AMH = antimüllerian hormone; AFC = antral follicular count; ASCOT = autologous stem cell ovarian transplant; BMI = body mass index; COS = controlled ovarian stimulation; MII = metaphase II oocytes; NS = not significant.

Herraiz. Ovarian reserve after stem cell therapy. *Fertil Steril* 2018.

are recorded in Table 2. Oocyte pick-up was performed in 70.8%; MII oocytes were obtained in 54.2% and embryos in 50% of the initiated stimulations, with a 29.2% cancellation rate. Briefly, a total of 35 MII oocytes and 24 embryos were obtained. Thirteen embryos were considered as good quality based on morphological criteria, and therefore were transferred; however, pregnancy was not achieved in any patient.

During the descriptive observational study, a total of 28 COS were initiated in 78 days (31–109 days) after ASCOT, and the IVF outcomes are recorded in Table 2. When compared with previous cycles, the following variables improved: oocyte pick-up was successfully performed in 85.7% (24 of 28) of the initiated cycles, MII oocytes were obtained in 82.1%, and embryos in 67.8% (19 of 28). The cancellation rate was also significantly reduced to 14.2% (4 of 28). After ASCOT, a total of 51 MII oocytes were retrieved and 36 embryos were obtained after ICSI. Of these, 60% were A/B quality embryos by morphological criteria. Thirty-one reached the blastocyst stage and underwent comparative genomic hybridization analysis. Five were euploid and then transferred in single ET/Two clinical pregnancies resulted, but one ended in miscarriage. Individual IVF outcomes are shown in Supplemental Table 3 (available online). Five pregnancies were achieved during the follow-up period, and three healthy babies have been born from 15 women who are poor responders, achieving a treatment PR of 33.3%. One patient delivered twice, another patient delivered once, and a third patient had two miscarriages at weeks 10 and 8 of pregnancy. Three of the five pregnancies reported in the present study were achieved by natural conception.

A subsequent analysis showed that only four post-ASCOT cycles were initiated in optimal conditions. Nevertheless, paired comparison between stimulations initiated before and after ASCOT (Table 2) showed that stem cell infusion increased, using similar gonadotropin dose and stimulation days, the total AFC, the AFC in the infused ovary, as well as the number of punctured follicles. In addition, the fertilization rate was also improved after ASCOT (68.6% vs. 74.5%; $P=.01$) and the cancellation rate was reduced. The increase in the number of antral follicles was significantly higher when comparison was done with the optimal COS (Table 2).

In addition, a subanalysis compared the best previous COS, considered as the one with the highest number of punctured follicles, with the best COS after ASCOT was performed (Table 3). Statistically significant increases were detected in the total number of antral follicles, the number of antral follicles in the infused ovary, and the total number of follicles measuring >16 mm ($P=.036$, $P=.026$, and $P=.05$, respectively).

DISCUSSION

In the present pilot study, a new BMDSC-based therapy was used to treat 15 women, who are poor responders and with very bad prognosis, and who underwent 24 previous IVF cycles after being diagnosed as poor responders. Using this approach, five pregnancies were achieved—three of them

TABLE 3

Reproductive outcomes before and after autologous stem cell ovarian transplant.

| Characteristics | Previous | After ASCOT | P Value |
|---------------------------------------|-----------------|---------------|---------|
| FSH dose (IU) | 3,623 ± 1,444 | 4,201 ± 1,342 | NS |
| Days of stimulation | 10.5 ± 2.7 | 9.9 ± 3.8 | NS |
| E ₂ day hCG administration | 1,079.4 ± 736.5 | 720.7 ± 512.2 | NS |
| Antral follicles (total) | 4 ± 1.9 | 5.8 ± 1.7 | .036 |
| Control ovary | 2.5 ± 1.0 | 2.8 ± 1.5 | NS |
| Infused ovary | 1.9 ± 0.7 | 2.9 ± 1.4 | .026 |
| Follicles >16 mm (total) | 2.6 ± 1.8 | 2.9 ± 1.2 | .05 |
| Control ovary | 1.2 ± 1.0 | 1.5 ± 1.1 | NS |
| Infused ovary | 1.2 ± 1.5 | 1.5 ± 1.2 | NS |
| Punctured follicles (total) | 4.0 ± 3.1 | 4.7 ± 1.9 | NS |
| Control ovary | 2 ± 2.1 | 1.9 ± 1.0 | NS |
| Infused ovary | 1.5 ± 1.8 | 2.1 ± 1.7 | NS |
| Retrieved MII (total) ^a | 2.3 ± 2.0 | 2.6 ± 1.6 | NS |
| 0 | 4 | 2 | |
| 1 | 4 | 10 | |
| 2 | 1 | 4 | |
| 3 | 5 | 5 | |
| ≥4 | 3 | 3 | |
| No oocyte pick-up | 7 | 3 | |
| Retrieved MII (control ovary) | 0.5 ± 1.0 | 1.4 ± 1.0 | NS |
| Retrieved MII (infused ovary) | 0.3 ± 0.5 | 1.2 ± 1.0 | NS |
| Total embryos by cycle ^a | 1.7 ± 1.5 | 2.1 ± 1.6 | NS |
| 0 | 4 | 4 | |
| 1 | 5 | 12 | |
| 2 | 4 | 2 | |
| ≥3 | 3 | 5 | |
| Embryos (control ovary) | — | 1.0 ± 1.2 | |
| Embryos (infused ovary) | — | 1.1 ± 0.9 | |
| Canceled COS | 4/15 (26.6%) | 1/15 (6.6%) | NS |

Note: Values are shown as mean ± SD. Laterality data for the obtained embryos in previous cycles was not available in all cases and therefore omitted. Nonparametric Wilcoxon paired test was used to compare outcomes from best COS before and after ASCOT. ASCOT = autologous stem cell ovarian transplant; COS = controlled ovarian stimulation; MII = metaphase II oocytes; NS = not significant.

^a Refers only to COS with oocyte retrieval.

Herraiz. Ovarian reserve after stem cell therapy. *Fertil Steril* 2018.

spontaneous, and 3 healthy babies were born after the stem cell administration.

Considering AFC and/or serum AMH, we observed an improvement in ovarian function in 81% of patients after intra-arterial delivery of BMDSCs. This beneficial effect was observed within 4 weeks of treatment. Reproductive outcomes also improved when COS was compared before and after stem cell administration. The ASCOT resulted in an increased number of antral follicles, especially in the infused ovary, and retrieved oocytes, significantly reducing the cancellation rate during the IVF phase of our observational study. When only those cycles performed after a positive response were considered, increases in the number of antral follicles and decreases in cancellation rate were even higher, although these changes were also observed even when stimulations were not started in optimal conditions. Interim data analyses established the optimal time point as day 15 after ASCOT for the

first stimulation, and with subsequent stimulations occurring after reaching one of the defined ASCOT success criteria.

These findings could represent an entirely new approach as the absence of antral, gonadotropin-dependent, stimutable follicles has been considered the main limitation in the management of patients who are poor responders (7). At present, clinical approaches are mostly based on the use of different stimulation protocols (6, 26), but success was rarely obtained due to the lack of follicles. Furthermore, fewer cancellations, an increased risk in women who are poor responders/poor prognosis during stimulation (37.8%), resulted in our poor responders achieving a 14.2% cancellation rate, similar to the rate (13.3%) predicted for patients with good prognosis (27). The ASCOT overcomes these concerns and allowed successful oocyte pick-up in 85.7% of the initiated cycles. Altogether, proper gonadotropin regimen with the increased amount of gonadotropin-stimulable follicles and the reduced cancellation rate would be crucial to increase the reproductive potential in poor responders undergoing ART by increasing PRs and reducing costs to patients and IVF units (28).

The relationship between positive response and the presence of soluble growth factors secreted by circulating BMDSC into plasma was established as a paracrine effect, which has been proposed to play a key role in tissue regeneration induced by adult stem cells (19). We observed an association between the presence of FGF-2 in plasma and the improvement of both ovarian reserve biomarkers. The FGF-2, the protein and its receptor, is expressed in early human follicles and plays a key role in estrogen (E) production, and its overexpression is associated with the improvement of follicular development and the neoangiogenesis that maintains follicle growth in the ovarian niche (20–22, 29). In fact, FGF-2 promotes transplantation-mediated therapeutic effects of mesenchymal stem cells after brain injury in rodents and its levels diminish with aging (30). In our study, THSP-1 was also positively correlated with AFC and AMH enhancement. This factor is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis (31, 32), and its overexpression has been associated with regenerative effects induced by CD133 cell therapy in an animal model of endometrial disease (33). This regenerative cell-independent mechanism has been recently proposed to induce tissue repair through the injection of young growth factor-enriched plasma into damaged and aged organisms (34–36). This suggests that tissue damage and aging could be, in part, attributed to changes in bloodborne factors (37). Thus, the presence of circulating FGF-2 and THSP-1 after BMDSC mobilization could explain why improved AFC was observed in both ovaries in several patients. Nevertheless, our study showed that the presence of stem cells in the ovaries allows for a continuous secretion of these molecules, inducing better and more durable effects in the injected ovary.

We simultaneously assessed whether cell composition of apheresis, the G-CSF treatment, and the CD133 mobilization rate, one of its main outcomes, were correlated with the success of ASCOT in patients who are poor responders. None of them was able to predict the optimization of the ovarian

reserve. However, induction of regenerative effects in rodent (38) and human (39) reproductive tissues have been previously reported after G-CSF administration, and therefore their effect on the ovarian reserve should be carefully elucidated. Notably, in our study, all patients were injected with the same number of cells independent of their mobilization rate, and therefore further research is needed to elucidate whether mobilization and posterior cell circulation are sufficient to induce a relevant effect in the ovaries.

The positive AFC response in women who are poor responders was detected mainly during the first 4 weeks after treatment, suggesting that the secondary follicles at the time of treatment were likely the main beneficiaries of ASCOT. Rapid growth of secondary follicles to produce preovulatory follicles in a few weeks has been also reported by Kawamura et al. (7) in patients with POI, after the application of other *in vitro* activation and ovarian fragmentation procedures, and validated in animal models (8–10). Poor responders typically have a low number of stimulus-responsive antral follicles (7), but this does not necessarily mean that they are completely devoid of small preantral follicles (40). Thus, although these patients do have follicles, a damaged ovarian niche might not be able to maintain the physiological requirements (41) necessary for the rapid proliferation and differentiation of granulosa cells (GCs) (42). Growing follicles also need to establish an adequate vascular network (43) to develop, and poor response is associated with a reduced ovarian blood flow (44). Therefore, the impairment in vascularization might contribute to their absence of ovarian response. As described, both soluble factors associated with the positive ASCOT response in our study have a crucial role in inducing neoangiogenesis (20–22). In fact, enhancement of local vascularization has been described as a main effect of BMDSC infusion in human and mouse ovarian tissues, mimicking chemotherapy-induced poor responder and POI conditions (16, 17). All together, our results suggest that stem cells and soluble factors can improve the niche and allow these preantral follicles to grow and be ovulated.

On the other hand, ASCOT allowed embryo generation in 67.8% of initiated cycles and generated a total of 36 embryos without increasing the amount of gonadotropins or the stimulation days. However, we realize that although it has positive effects, stem cell infusion did not modify embryo euploidy, which was already a concern in our aged group of poor responders (2). Only 16.1% of embryos were euploid. Nevertheless, a 33.3% PR was achieved in women with poor prognosis, where oocyte donation was the only practical option after several IVF attempts and years of infertility. Half of the pregnancies were natural conceptions during the follow-up period, including two second pregnancies. Hence, the restoration of the ovarian niche to sustain follicle development might be a midterm effect after stem cell administration, as suggested by several consecutive spontaneous pregnancies achieved after BMDSC administration in animal models of POI and poor response (16, 17).

Despite encouraging findings, the high variability of the poor response population included in our study, even when applying the Bologna criteria (45), raises the possibility that

some effects induced by ASCOT could be masked, preventing the detection of more statistically significant differences. Therefore, the possibility of a more suitable target population for ASCOT should be addressed. Based on previous studies where ovarian function restoration was induced by other approaches in women with POI (8, 9) and supported by our studies reporting fertility rescue by BMDSC infusion in a POI animal model, we believe that ASCOT could be a feasible alternative before oocyte donation for young premenopausal and women with POI.

In summary, we found that ASCOT, using a semi-invasive and easily reproducible technique, optimized the mobilization of the existing ovarian reserve in patients who are poor responders and whose follicular endowment was impaired. Apheresis provided relevant components for engraftment ability and success including specific soluble factors. Thus, the role of noncellular components within ASCOT should be carefully assessed to allow for the use of cytokine and growth factor plasma content as a tool to induce and/or predict a positive ovarian response. Further work is needed to validate results in a larger and homogeneous population, as well as to follow-up on reproductive outcomes, before considering ASCOT as a real alternative to managing patients with an impaired ovarian function.

REFERENCES

- Evers JL. Female subfertility. *Lancet* 2002;360:151–9.
- Munne S, Cohen J, Sable D. Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril* 2002;78:234–6.
- Garcia-Velasco JA, Isaza V, Requena A, Martinez-Salazar FJ, Landazabal A, Remohi J, et al. High doses of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial. *Hum Reprod* 2000;15:2292–6.
- Kaspers GJ, Veerman AJ, Popp-Snijders C, Lomecky M, van Zantwijk CH, Swinkels LM, et al. Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1996;27:114–21.
- Bracewell-Milnes T, Saso S, Bora S, Ismail AM, Al-Memar M, Hamed AH, et al. Investigating psychosocial attitudes, motivations and experiences of oocyte donors, recipients and egg sharers: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2016;22:450–65.
- Kyroo D, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Bontis J, Tarlatzis BC. How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2009;91:749–66.
- Pellicer A, Ardiles G, Neuspiller F, Remohi J, Simon C, Bonilla-Musoles F. Evaluation of the ovarian reserve in young low responders with normal basal levels of follicle-stimulating hormone using three-dimensional ultrasonography. *Fertil Steril* 1998;70:671–5.
- Zhai J, Yao G, Dong F, Bu Z, Cheng Y, Sato Y, et al. In vitro activation of follicles and fresh tissue auto-transplantation in primary ovarian insufficiency patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:4405–12.
- Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:17474–9.
- Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Duan EK, et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:10280–4.
- Salooja N, Chatterjee R, McMillan AK, Kelsey SM, Newland AC, Milligan DW, et al. Successful pregnancies in women following single auto-transplant for acute myeloid leukemia with a chemotherapy ablation protocol. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:431–5.
- Salooja N, Szydlo RM, Socie G, Rio B, Chatterjee R, Ljungman P, et al. Pregnancy outcomes after peripheral blood or bone marrow transplantation: a retrospective survey. *Lancet* 2001;358:271–6.
- Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, et al. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:3045–52.
- Hershlag A, Schuster MW. Return of fertility after autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril* 2002;77:419–21.
- Veitia RA, Gluckman E, Fellous M, Soulier J. Recovery of female fertility after chemotherapy, irradiation, and bone marrow allograft: further evidence against massive oocyte regeneration by bone marrow-derived germline stem cells. *Stem Cells* 2007;25:1334–5.
- Herraiz S, Buigues A, Diaz-Garcia C, Romeu M, Pellicer A. Bone marrow derived stem cells promote vascularization and follicular growth in xenografted human ovarian cortex. In: SRI 63rd Annual Scientific Meeting. Montreal, Canada: Society for Reproductive Investigation; 2016.
- Herraiz S, Buigues A, Diaz-Garcia C, Romeu M, Martinez S, Gomez-Segui I, et al. Fertility rescue and ovarian follicle growth promotion by bone marrow stem cell infusion. *Fertil Steril* 2018;109:908–18, e2.
- Santamaria X, Cabanillas S, Cervello I, Arbona C, Raga F, Ferro J, et al. Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. *Hum Reprod* 2016;31:1087–96.
- Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008;103:1204–19.
- Abedini A, Zamberlam G, Lapointe E, Tourigny C, Boyer A, Paquet M, et al. WNT5a is required for normal ovarian follicle development and antagonizes gonadotropin responsiveness in granulosa cells by suppressing canonical WNT signaling. *FASEB J* 2016;30:1534–47.
- Price CA. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *J Endocrinol* 2016;228:R31–43.
- Liu J, Deutsch U, Jeong J, Lobe CG. Constitutive notch signaling in adult transgenic mice inhibits bFGF-induced angiogenesis and blocks ovarian follicle development. *Genesis* 2014;52:809–16.
- Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26:1616–24.
- La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artesisio AC, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16:113–30.
- Rubio C, Rodrigo L, Mir P, Mateu E, Peinado V, Milan M, et al. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril* 2013;99:1044–8.
- Pandian Z, McTavish AR, Aucutt L, Hamilton MP, Bhattacharya S. Interventions for 'poor responders' to controlled ovarian hyperstimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Database Syst Rev* 2010; CD004379.
- Lamazou F, Fuchs F, Grynberg M, Gallot V, Herzog E, Fanchin R, et al. [Cancellation of IVF-ET cycles: poor prognosis, poor responder, or variability of the response to controlled ovarian hyperstimulation? An analysis of 142 cancellations]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2012;41:41–7.
- Griffiths A, Dyer SM, Lord SJ, Pardy C, Fraser IS, Eckermann S. A cost-effectiveness analysis of in-vitro fertilization by maternal age and number of treatment attempts. *Hum Reprod* 2010;25:924–31.
- Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 2005;11:461–71.
- Liu Y, Yi XC, Guo G, Long QF, Wang XA, Zhong J, et al. Basic fibroblast growth factor increases the transplantation-mediated therapeutic effect of bone mesenchymal stem cells following traumatic brain injury. *Mol Med Rept* 2014;9:333–9.
- Garside SA, Harlow CR, Hillier SG, Fraser HM, Thomas FH. Thrombospondin-1 inhibits angiogenesis and promotes follicular atresia in a novel in vitro angiogenesis assay. *Endocrinology* 2010;151:1280–9.

32. Osz K, Ross M, Petrik J. The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:21.
33. Cervello I, Gil-Sanchis C, Santamaria X, Cabanillas S, Diaz A, Faus A, et al. Human CD133(+) bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertil Steril* 2015; 104:1552–60, e1–3.
34. Castellano JM, Kirby ED, Wyss-Coray T. Blood-borne revitalization of the aged brain. *JAMA Neurol* 2015;72:1191–4.
35. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, Castellano JM, Mosher KI, Luo J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med* 2014;20:659–63.
36. Villeda SA, Wyss-Coray T. The circulatory systemic environment as a modulator of neurogenesis and brain aging. *Autoimmun Rev* 2013;12:674–7.
37. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 2011;477:90–4.
38. Skaznik-Wikiel ME, McGuire MM, Sukhwani M, Donohue J, Chu T, Krivak TC, et al. Granulocyte colony-stimulating factor with or without stem cell factor extends time to premature ovarian insufficiency in female mice treated with alkylating chemotherapy. *Fertil Steril* 2013;99:2045–54.e3.
39. Gleicher N, Vidali A, Barad DH. Successful treatment of unresponsive thin endometrium. *Fertil Steril* 2011;95:2123.e13–7.
40. Visser JA, Schipper I, Laven JS, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:331–41.
41. Richardson RB, Allan DS, Le Y. Greater organ involution in highly proliferative tissues associated with the early onset and acceleration of ageing in humans. *Exp Gerontol* 2014;55:80–91.
42. Gougeon A, Chainy GB. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil* 1987;81:433–42.
43. Mauro A, Martelli A, Berardinelli P, Russo V, Bernabo N, di Giacinto O, et al. Effect of antiprogesterone RU486 on VEGF expression and blood vessel remodeling on ovarian follicles before ovulation. *PLoS One* 2014; 9:e95910.
44. Pan HA, Wu MH, Cheng YC, Wu LH, Chang FM. Quantification of ovarian stromal Doppler signals in poor responders undergoing in vitro fertilization with three-dimensional power Doppler ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:338–44.
45. Busnelli A, Papaleo E, del Prato D, la Vecchia I, Iachini E, Paffoni A, et al. A retrospective evaluation of prognosis and cost-effectiveness of IVF in poor responders according to the Bologna criteria. *Hum Reprod (Oxford, Engl)* 2015;30:315–22.



Treatment potential of bone marrow-derived stem cells in women with diminished ovarian reserves and premature ovarian failure

Sonia Herraiz^{a,b,*}, Nuria Pellicer^{c,*}, Mónica Romeu^{b,c},
and Antonio Pellicer^{a,b,d}

Purpose of review

We review the techniques recently tested in both animal models and humans to provide a state-of-the-art on adult stem cell ovarian transplant to achieve ovarian rejuvenation in patients with diminished ovarian reserves.

Recent findings

As the first reports of spontaneous pregnancies achieved after bone marrow transplantation in oncologic women with primary ovarian insufficiency, increasing evidence supports the regenerative effects of stem cell-based therapies in the ovarian niche. Adult stem cells from several origins promote follicular development, increase ovarian local vascularization, increase follicle and stromal cell proliferation and reduce cell apoptosis and follicular atresia, although they do not modify embryo quality. Therefore, residual quiescent follicles of aged or damaged ovaries might produce competent oocytes in an adequate ovarian environment. Nevertheless, further research is needed to properly evaluate underlying mechanisms, identify best cell sources and design less invasive infusion techniques.

Summary

Stem cells may be a relevant therapeutic alternative for ovary regeneration and follicular development in patients with impaired ovaries, such as poor ovarian responders or women diagnosed with primary ovarian insufficiency.

Keywords

adult stem cell, diminished ovarian reserve, follicular rescue, premature ovarian insufficiency, stem cell ovarian transplant

INTRODUCTION

Human ovaries contain a genetically determined limited pool of primordial follicles with both reproductive and endocrine functions [1,2]. The primordial follicle contains an oocyte — for the reproductive function — surrounded by granulosa cells, which fulfill the endocrine role. During reproductive life, many follicles activate and grow under stimulation with follicle-stimulating hormone (FSH), but only one becomes preovulatory during each ovulation cycle [3]. The remaining follicles constitute the ovarian reserve and can be depleted by harmful factors such as smoking [4], surgery or chemotherapy/radiotherapy [5,6], reducing a woman's reproductive potential.

The concept of a diminished ovarian reserve (DOR) first appeared when young patients exhibited similar response to controlled ovarian stimulation

(COS) with gonadotropins as did older patients [7,8]. These patients eventually were termed poor ovarian responders (PORs). A more severe condition is primary ovarian insufficiency (POI), characterized by amenorrhea, hypogonadism and elevated serum gonadotropin levels; previously referred to

^aFundación IVI, ^bReproductive Medicine Research Group, IIS La Fe, ^cWomen's Health Area, La Fe University Hospital, Av. Fernando Abril Martorell, Valencia, Spain and ^dIVI-RMA Rome, Largo Ildebrando Pizzetti, Rome, Italy

Correspondence to Sonia Herraiz, PhD, Fundación IVI, Av. Fernando Abril Martorell, 106 Torre A 1^a, 46026 Valencia, Spain.
Tel: +34 6 390 33 05; e-mail: Sonia.Herraiz@ivirma.com

*Sonia Herraiz and Nuria Pellicer these authors should be considered similar in author order.

Curr Opin Obstet Gynecol 2019, 31:000–000

DOI:10.1097/GCO.0000000000000531

KEY POINTS

- Infusion of human-derived stem cells could supply an adequate ovarian niche to maintain or promote follicular rescue in patients with impaired or aged ovarian reserves.
- Long-term fertility rescue has been achieved in chemotherapy-induced mouse ovaries mimicking aging, POR or POI after infusion of adult stem cell from different origins as well as several administration techniques, providing scientific evidence to design new alternatives and therapies for humans.
- Human studies propose BMDSCs, both mesenchymal and hematopoietic, which are feasible candidates to promote ovarian rejuvenation, as several pregnancies and live births have been reported after ovarian transplant of BMDSCs in women who are POR or diagnosed with POI.

as premature menopause or premature ovarian failure (POF) [9] this condition affects 1% of women below 40 years old. The main difference between PIO and menopause is the unpredictability of ovarian function, as 5–10% of women with POI may still conceive [10]. The incidence of POI increases with cancer survival, thus POI together with POR and the increasing number of women delaying motherhood pose significant challenges for reproductive medicine.

Many strategies based on COS protocols have been developed to treat impaired ovaries [11]. Unfortunately, there is no specific or successful gold-standard treatment for patients with DOR, POR and/or POI [12–18]. Within this context, cellular therapies have emerged from other medical fields [19] as alternatives to recover ovarian function. For instance, hematologic stem cell treatments have achieved endometrial regeneration and pregnancy in women with Asherman syndrome [20].

In this review, we aim to provide a state-of-the-art for the use of stem cells as a tool to optimize the remaining ovarian reserve in patients with impaired ovaries. Advantages and limitations of cell sources and administration techniques are carefully assessed in both animal and human models to provide an overview of the limited ovarian cell therapy approaches currently available in humans.

Adult stem cell-based therapies to promote follicle development

A small pool of residual quiescent follicles remains in the ovaries of women with DOR, POI or established menopause. These primordial follicles could

potentially be rescued and grown to increase the final yield of oocytes, if an appropriate and supportive ovarian niche is provided by different approaches [21,22*].

ANIMAL STUDIES

The possibility of adult stem cell-based therapies to restore ovarian function arose from animal studies, mainly in rodents with chemotherapy-induced POF. Adult stem cells from both hematopoietic and mesenchymal/stromal types have been tested, although mesenchymal cells with various origins have been the target of most preclinical approaches developed in the past decade. Mesenchymal stem cells (MSCs) display high replication capacity and in-vitro differentiation potential into chondrocytes, osteocytes and adipocytes [23], and they can be found in various adult tissues [24–30].

In the field of reproductive medicine, the ability of human MSCs to survive, engraft and proliferate into the ovaries was first assessed by Liu *et al.* [31] using human amniotic fluid MSCs in a cyclophosphamide-based POF mouse model. Direct ovarian infusion of mouse amniotic fluid MSCs improves ovarian function by reducing atresia, maintaining development of surviving follicles and restoring estrous cyclicity, allowing short-term fertility recovery and generation of offspring [32]. Amniotic epithelial cell (AEC) and amniotic mesenchymal cells (AMSCs) can also be easily isolated from amniotic membranes and discarded after delivery, allowing recovery of clinically relevant cell values. Both human AECs and AMSCs have been successfully tested in rodents with different grades of chemotherapy-induced ovarian damage ranging from DOR to established POF [33]. Recovery of hormone production, differentiation into granulosa cells and restoration of folliculogenesis after infusion of hAECs are reported [34], although hAMSCs show further benefits [33].

Umbilical cord blood has been considered a feasible source of MSCs, with promising results for several degenerative diseases outside the reproductive system [35,36]. When transplanted into ovaries, umbilical cord blood MSCs protect follicular cells against apoptosis [37], promoting follicle development and estradiol secretion. These findings have been confirmed in both chemotherapy-treated [38–40] and naturally aged perimenopausal rat ovaries [41] and seem to be mediated by an indirect effect on the ovarian epithelium and niche via expression of key regulators for apoptosis and folliculogenesis, such as cytokeratin 8/18, transforming growth factor β (TGF- β) and proliferating cell nuclear antigen [40].

Human menstrual blood-derived endometrial stem cells (MenSCs) have been recently proposed

as a therapeutic tool for ovarian disorders [25,27,42,43] based on their multipotency, proliferation rate and reduced immunogenicity, as well as the feasibility of noninvasive collection [44]. MenSCs promote similar positive effects on folliculogenesis, hormone production and apoptosis to that described for amniotic and umbilical cord blood MSCs. Further, MenSCs can differentiate into granulosa cells [27] and can partially restore long-term fertility.

Nevertheless, the absence of an autologous source for these MSCs should be considered a limitation to their application for cell therapy in already aged and POI patients without previously cryopreserved umbilical cord blood or amniotic membranes or in the absence of menses, such as women with POI. On the basis of these issues, other autologous cell sources have been tested, such as adipose tissue [45] and bone marrow. In fact, adipose MSCs [46,47] reduce ovarian apoptosis and recover ovulation in a chemoablated mouse model by inducing POF-related gene expression and secretion of paracrine cytokines [47]. However, ovarian effects seem to be weaker than observed for amniotic-derived MSCs [48].

In the bone marrow, MSCs represent less than 1% of mononuclear cells but can be isolated and cultured based on their adherence [49]. When assayed in chemotherapy-induced POF models [24,43,50–54], bone marrow-MSCs engraft and proliferate over long times in the ovarian stroma [43], protecting germ cells from apoptosis [54] and recovering ovarian function by increasing the number of growing follicles and litter size compared to noncell-treated mice [24,52]. Although MSC-based therapy solves the concern of an autologous cell source, it still requires several culture and isolation techniques [55] to reach relevant cell numbers [56]. Cells can lose their specific regenerative properties after *in vitro* culture [57] and can accumulate epigenetic modifications or chromosomal aberrations [58]. To avoid this, reproductive medicine research uses protocols developed for the treatment of hematological malignancies to increase proliferation and stem cell mobilization from bone marrow to peripheral blood by using cytokines such as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) [59], allowing noninvasive collection of appropriate stem cell numbers from bone marrow and avoiding invasive collection by iliac crest aspiration [60].

Bone marrow-derived stem cells (BMDSCs) represent a heterogeneous group of mononuclear cells with multidifferentiation potential that includes several hematopoietic, mesenchymal and endothelial stem/progenitor cells [61,62]. These multiple regenerative effects on the ovarian stroma have been observed by intravenous infusion of the whole

population of human BMDSCs into two different mouse models for DOR and POF, where BMDSCs recover long-term fertility by increasing local ovarian vascularization, increasing follicular and stromal cell proliferation and reducing apoptosis [22[■]]. This unique study using human ovarian tissues from POR patients demonstrated for the first time that BMDSCs can engraft close to human follicles and vessels, promoting follicle development and ovarian niche regeneration and vascularization. Importantly, these functions are crucial to maintain follicle growth and maturation cycle [63]. Further work demonstrates the ‘homing’ ability of BMDSCs into ovarian tissue [43], showing that direct ovarian injection [52] is not needed to induce positive ovarian effects [22[■],33,64]. This finding is of paramount relevance to design less invasive approaches for clinical practice.

Overall, animal studies suggest that stem cell-based therapies could be a suitable option to increase reproductive potential of aging women and women with DOR, POR and POI, in which the ovarian niche cannot maintain growth of their residual follicular pool. In these instances, autologous BMDSCs may be a feasible cell source to recover ovarian function.

HUMAN STUDIES

To date, studies have attempted to regenerate the damaged ovarian niche by offering an appropriate environment to women with impaired ovarian reserves. Many researchers have been attracted by autologous stem cells derived from different tissues [22[■],65,66[■],67–69]. Other researchers have focused their attention on different approaches, such as platelet-rich-plasma [70], based on the suggested regenerative mechanism for adult stem cells via paracrine secretion of soluble factors (cytokines, chemokines and growth factors) [71] that could also be implicated in the activation of primordial follicles in impaired ovaries. In fact, some of these stem cell-secreted soluble growth factors have already been related to follicular growth, normal ovarian function and ovarian response to COS. Folliculogenesis involves not only pituitary gonadotrophins (luteinizing hormone and FSH), but also multiple paracrine and autocrine factors produced in the ovary, including prostaglandins, steroid hormones and several families of growth factors, such as insulin-like growth factor-1, TGF- β , epidermal growth factor and fibroblast growth factor (FGF). For instance, FGF-2 acts on granulosa cells to promote cell proliferation and inhibit apoptosis [72–74] and has been related to positive ovarian response to stem cell therapy [75[■]].

Several factors influence the proposed ovarian regenerative therapies (Table 1) [65,66[■],69,75[■]]. One is the stem cell administration technique — although animal studies show that direct ovarian infusion is not required, human stem cells have been infused into one or both ovaries by various methods, such as direct injection via laparoscopy, transvaginal ultrasound-guided injection [65,66[■],70], intra-arterial catheterization of the ovarian artery [22[■]] or a combination of techniques [69]. Further research is needed to determine the most effective approach, although less invasive methods are needed for both stem cell collection and instillation.

Stem cell source also appears to be an important factor. Several spontaneous pregnancies indicate that BMDSCs can recover ovarian function in patients with POI because of cancer treatment [76–80]. On the basis of this evidence, our group has used BMDSCs to reactivate the ovarian niche, showing activated human follicle growth in mouse and xenografted human ovarian tissues [22[■]]. Further, we

used BMDSCs to reactivate and rescue human follicles in a prospective pilot study [22[■]].

In addition, a published study [75[■]] performed autologous cell ovarian transplantation (ASCOT) in 17 POR women (<40 years old) according to European Society of Human Reproduction and Embryology criteria [81], with a total 24 previous in-vitro fertilization cycles as POR (3–5 years infertility). First, stem cells were mobilized from bone marrow to peripheral blood by subcutaneous administration of G-CSF. Then, BMDSCs, including both haematopoietic and mesenchymal stromal cells, were isolated by apheresis and infused by intra-arterial catheter into one ovarian artery. Ovarian reserve biomarkers [antral follicle count (AFC) and antimüllerian hormone (AMH)] improved in up to 81.3% patients, which positively correlated with the presence of circulating growth factors FGF-2 and thrombospondin 1. The increase in AFC was statistically significant on day 15, although both AFC and AMH increased during the first 4 weeks after ASCOT. ASCOT treatment achieved five pregnancies (three

Table 1. Human studies involving bone marrow stem cell treatment for premature ovarian insufficiency-poor ovarian responder and perimenopausal patients

| Regenerative factor | Study population | Administration method | Main findings | Limitations | Reference |
|---------------------|--|--|--|---|--|
| BM-MSC | 10 women with idiopathic POI (<40 years old) | BM-MSCs into both ovaries via laparoscopy | Resumption of menses in 20% patients after 3 months 10% treatment POR One pregnancy and a live birth in one patient showing endometrial regeneration | POR similar to that reported for POI patients without treatment | Edessy <i>et al.</i> [65] |
| BM-MSC | 1 perimenopausal woman (45-year old) | BM-MSCs into both ovaries via laparoscopy | AFC and AMH increased 8 weeks after treatment 1 live birth | POR similar to that reported for POI patients without treatment | Gupta <i>et al.</i> [66 [■]] |
| BM-MSC | 30 patients with POF (18–40 years old) | Direct laparoscopic infusion into the ovarian stroma and catheterism into the ovarian artery of one side | 86.7% POF patients improved hormone profile 4 week after treatment 60% showed ovulation 3 patients underwent IVF 1 spontaneous pregnancy | AFC not reported or compared between ovaries. IVF outcomes were not reported | Gabr <i>et al.</i> [69] |
| BM-MSC | 33 patients with idiopathic/other POF/POI and low ovarian reserves | BM-MSCs into both ovaries via laparoscopy | Not yet reported | Still ongoing | Al-Hendy <i>et al.</i> , (NCT02696889) |
| BMDSC | 15 POR patients (<40 years old) | One ovarian artery by intraarterial catheterism | 81.3% POR improved AFC and AMH 2 weeks after the treatment 33.3% treatment pregnancy rate 5 pregnancies and 3 live births | 16% euploidy rate because of advanced maternal age was not ameliorated | Herraiz <i>et al.</i> , [75 [■]] |

AFC, antral follicle count; AMH, antimüllerian hormone; BMDSCs, bone marrow-derived stem cells; BM-MSCs, bone marrow mesenchymal stem cells; IVF, in-vitro fertilization; POF, premature ovarian failure; POI, premature ovarian insufficiency; POR, poor ovarian responder.

spontaneous) and three live births, whereas cycles before ASCOT achieved no pregnancies in 15 POR who completed the study. However, age-associated aneuploidies were not ameliorated (16% euploidy rate). The ASCOT technique's 33.3% treatment pregnancy rate suggests that invasive cell collection, selection/culture procedures and direct infusion into the ovarian stroma are not required to restore fertility. In fact, AFC also improved in the noninfused ovary, suggesting positive effects of circulating BMDSCs during mobilization.

All other human studies have involved cell culture and use of the bone marrow-MSC fraction collected by iliac crest aspiration. By this approach, Gupta *et al.* [66[□]] reported a baby born to a 45-year-old premenopausal woman after autologous bone marrow-MSC therapy. In this study, bone marrow was aspirated from the posterior iliac crest, and MSCs were instilled into both ovaries by laparoscopy. After 8 weeks, ovarian reserve markers AFC and AMH improved, so an IVF cycle was initiated. A healthy baby was born 11 months after treatment months, although this study only reports one case.

Similarly, Edessy *et al.* [65] injected autologous bone marrow-MSCs from bone of 10 women with idiopathic POI (<40 years old) into both ovaries via laparoscopy. Injection induced resumption of menses in two patients (20%), with one pregnancy and a live birth in one patient (10% treatment pregnancy rate). Similar results were reported by Gabr *et al.* [69] in 30 patients with POF (18–40 years old) transplanted with autologous bone marrow-MSCs. In addition, this study also implies that G-CSF mobilizes cells [75[□]], although Gabr *et al.* [69] aspirated cells from the iliac crest and infused them using a combination of two methods (direct laparoscopic infusion into the ovarian stroma and catheter into the ovarian artery) into the same ovary. Four weeks after cell infusion, 86.7% of POI patients showed an ameliorated hormone profile, which was maintained for up to 2 years. Three patients underwent IVF cycles and one patient had a spontaneous pregnancy (3.3% treatment pregnancy rate). A similar study is being developed by El Andaloussi *et al.* [64] (NCT02696889) using autologous MSCs from the iliac crest laparoscopically infused into the ovaries of 33 patients with idiopathic and other types of POF/POI and low ovarian reserves. This study is based on the authors' previous work in animal models [82].

In contrast, Pantos *et al.* [70] introduced a different technique without the direct use of stem cells to reactivate folliculogenesis in perimenopausal women. In this study, the ovaries of eight perimenopausal women of advanced maternal age (41–49

years old) were infused with platelet-rich plasma by transvaginal ultrasound-guided injection. Treatment resulted in the restoration of menses, with the presence of ovarian follicles that allowed oocyte retrieval after IVF treatment in all patients and cryopreservation of 1.50 ± 0.71 embryos. However, a limitation of the study is that it only included eight women and did not document their previous ovarian reserves.

CONCLUSION

This new field of investigation currently indicates that BMDSCs could be an alternative in ovary regeneration and follicular development for women who are POR or have POI. Nevertheless, despite promising reports of bone marrow-MSCs in POI patients, these results should be carefully evaluated and POI patients should be well diagnosed, as resumption of ovarian function has been reported in 23% of untreated POI patients, known as intermittent POI or fluctuating FSH, during their first year of amenorrhea [83]. To date, the ASCOT approach involving the whole BMDSC population seems to be a good approach to treat women who are POR, with a 33.3% treatment pregnancy rate. This treatment should also be investigated in POI patients, where autologous MSCs have resulted in three reported pregnancies in a total of 41 POI patients included in the three published studies to date [65,66[□],69].

Acknowledgements

None.

Financial support and sponsorship

This work has been partially supported by Grant PROM-ETEO/2018/137 by the Regional Valencian Ministry of Education and S.H. participation funded by a grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (PTQ-16–08222).

Conflicts of interest

S.H. reports personal fees from Ovascience outside the submitted work. The remaining authors declare no conflicts.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Mamsen LS, Lutterodt MC, Andersen EW, *et al.* Germ cell numbers in human embryonic and fetal gonads during the first two trimesters of pregnancy: analysis of six published studies. *Hum Reprod* 2011; 26:2140–2145.

2. Lew R. Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018; 18:30127–30135.
 3. Zeleznik AJ. Follicle selection in primates: 'many are called but few are chosen'. *Biol Reprod* 2001; 65:655–659.
 4. Sun L, Tan L, Yang F, *et al.* Meta-analysis suggests that smoking is associated with an increased risk of early natural menopause. *Menopause* 2012; 19:126–132.
 5. Meirow D. Reproduction postchemotherapy in young cancer patients. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:123–131.
 6. Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, *et al.* Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5307–5314.
 7. Garcia-Velasco JA, Isaza V, Requena A, *et al.* High doses of gonadotrophins combined with stop versus nonstop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial. *Hum Reprod* 2000; 15:2292–2296.
 8. Devine K, Mumford SL, Wu M, *et al.* Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181,536 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System. *Fertil Steril* 2015; 104:612–619; e3.
 9. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update* 2005; 11:391–410.
 10. Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *New Engl J Med* 2009; 360:606–614.
 11. La Marca A, D'Ippolito G. Ovarian response markers lead to appropriate and effective use of corifollitropin alpha in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2014; 28:183–190.
 12. Kyrou D, Kolibianakis EM, Venetis CA, *et al.* How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2009; 91:749–766.
 13. Chen Q, Wang Y, Sun L, *et al.* Controlled ovulation of the dominant follicle using progestin in minimal stimulation in poor responders. *Reprod Biol Endocrinol* 2017; 15:71.
 14. Dunne C, Seetharam K, Roberts J. Growth hormone supplementation in the luteal phase before microdose GnRH agonist flare protocol for in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Can* 2015; 37:810–815.
 15. Olgan S, Humaidan P. GnRH antagonist and letrozole co-treatment in diminished ovarian reserve patients: a proof-of-concept study. *Reprod Biol* 2017; 17:105–110.
 16. Qin N, Chen Q, Hong Q, *et al.* Flexibility in starting ovarian stimulation at different phases of the menstrual cycle for treatment of infertile women with the use of in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2016; 106:334–341.
 17. Yu R, Jin H, Huang X, *et al.* Comparison of modified agonist, mild-stimulation and antagonist protocols for in vitro fertilization in patients with diminished ovarian reserve. *J Int Med Res* 2018; 46:2327–2337.
 18. Chern CU, Tsui KH, Vitale SG, *et al.* Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation improves in vitro fertilization outcomes of poor ovarian responders, especially in women with low serum concentration of DHEA-S: a retrospective cohort study. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16:90.
 19. Gurusamy N, Alsayari A, Rajasingh S, Rajasingh J. Adult stem cells for regenerative therapy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2018; 160:1–22.
 20. Santamaria X, Cabanillas S, Cervello I, *et al.* Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. *Hum Reprod* 2016; 31:1087–1096.
 21. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, *et al.* Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:17474–17479.
 22. Herraiz S, Buigues A, Diaz-Garcia C, *et al.* Fertility rescue and ovarian follicle growth promotion by bone marrow stem cell infusion. *Fertil Steril* 2018; 109:908–918.
- First report of the effects of bone marrow-derived stem cells into human ovarian tissues. tem cells promoted growth of human follicles and stroma regeneration.
23. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6:230–247.
 24. Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, *et al.* Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy* 2013; 15:64–75.
 25. Wang Z, Wang Y, Yang T, *et al.* Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8:11.
 26. Lai D, Wang F, Chen Y, *et al.* Human amniotic fluid stem cells have a potential to recover ovarian function in mice with chemotherapy-induced sterility. *BMC Dev Biol* 2013; 13:34.
 27. Lai D, Wang F, Yao X, *et al.* Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *J Transl Med* 2015; 13:155.
 28. Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, *et al.* Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol* 2007; 25:3198–3204.
 29. Kern S, Eichler H, Stoeve J, *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24:1294–1301.
 30. Wagner W, Wein F, Seckinger A, *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33:1402–1414; *Experimental hematology* 16.
 31. Liu T, Huang Y, Guo L, *et al.* CD44+/CD105+ human amniotic fluid mesenchymal stem cells survive and proliferate in the ovary long-term in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Int J Med Sci* 2012; 9:592–602.
 32. Xiao GY, Liu IH, Cheng CC, *et al.* Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One* 2014; 9:e106538.
 33. Ding C, Li H, Wang Y, *et al.* Different therapeutic effects of cells derived from human amniotic membrane on premature ovarian aging depend on distinct cellular biological characteristics. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8:173.
 34. Wang F, Wang L, Yao X, *et al.* Human amniotic epithelial cells can differentiate into granulosa cells and restore folliculogenesis in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4:124.
 35. Castellano JM, Kirby ED, Wyss-Coray T. Blood-borne revitalization of the aged brain. *JAMA Neurol* 2015; 72:1191–1194.
 36. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, *et al.* Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med* 2014; 20:659–663.
 37. Wang S, Yu L, Sun M, *et al.* The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure. *Biomed Res Int* 2013; 2013.
 38. Song D, Zhong Y, Qian C, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model. *Biomed Res Int* 2016; 2016.
 39. Zhu SF, Hu HB, Xu HY, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries. *J Cell Mol Med* 2015; 19:2108–2117.
 40. Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouny SA, Eldomiati MA. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: possible direct and indirect effects. *Tissue Cell* 2016; 48:370–382.
 41. Li J, Mao Q, He J, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8:55.
 42. Lv H, Hu Y, Cui Z, Jia H. Human menstrual blood: a renewable and sustainable source of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9:325.
 43. Liu J, Zhang H, Zhang Y, *et al.* Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Mol Cells* 2014; 37:865–872.
 44. Liu Y, Niu R, Yang F, *et al.* Biological characteristics of human menstrual blood-derived endometrial stem cells. *J Cell Mol Med* 2018; 22:1627–1639.
 45. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13:4279–4295.
 46. Su J, Ding L, Cheng J, *et al.* Transplantation of adipose-derived stem cells combined with collagen scaffolds restores ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency. *Human Reprod* 2016; 31:1075–1086.
 47. Sun M, Wang S, Li Y, *et al.* Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4:80.
 48. Fouad H, Sabry D, Elsetohy K, Fathy N. Therapeutic efficacy of amniotic membrane stem cells and adipose tissue stem cells in rats with chemically induced ovarian failure. *J Adv Res* 2016; 7:233–241.
 49. Satija NK, Singh VK, Verma YK, *et al.* Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. *J Cell Mol Med* 2009; 13:4385–4402.
 50. Bao R, Xu P, Wang Y, *et al.* Bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation rescues premature ovarian insufficiency induced by chemotherapy. *Gynecol Endocrinol* 2018; 34:320–326.
 51. Ghadami M, El-Demerdash E, Zhang D, *et al.* Bone marrow transplantation restores follicular maturation and steroid hormones production in a mouse model for primary ovarian failure. *PLoS One* 2012; 7:e32462.
 52. Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, *et al.* Human mesenchymal stem cells partially reverse infertility in chemotherapy-induced ovarian failure. *Reprod Sci* 2018; 25:51–63.
 53. Fu X, He Y, Xie C, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy* 2008; 10:353–363.
 54. Kilic S, Pinarli F, Ozogul C, *et al.* Protection from cyclophosphamide-induced ovarian damage with bone marrow-derived mesenchymal stem cells during puberty. *Gynecol Endocrinol* 2014; 30:135–140.
 55. Odabas S, Elcin AE, Elcin YM. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol* 2014; 1109:47–63.
 56. Hoch AI, Leach JK. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3:643–652.

57. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, *et al.* Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis* 2013; 4:e950.
58. Lund RJ, Narva E, Lahesmaa R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet* 2012; 13:732–744.
59. de la Rubia J, Lorenzo JI, Torrabadella M, *et al.* Basal CD34 (+) cell count predicts peripheral blood progenitor cell mobilization and collection in healthy donors after administration of granulocyte colony-stimulating factor. *Haematologica* 2004; 89:1530–1532.
60. Narbona-Carceles J, Vaquero J, Suarez-Sancho S, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell aspirates from alternative sources: is the knee as good as the iliac crest? *Injury* 2014; 45(Suppl 4):S42–S47.
61. Hirschi KK, Goodell MA. Hematopoietic vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 2002; 9:648–652.
62. Zhang M, Huang B. The multidifferentiation potential of peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res Ther* 2012; 3:48.
63. Fraser HM. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4:18.
64. El Andaloussi A, Igboeli P, Amer A, Al-Hendy A. Intravenous infusion of nucleated peripheral blood cells restores fertility in mice with chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Biomedicines* 2018; 6:93.
65. Edessy M, Hosni H, Shady Y, *et al.* Autologous stem cells therapy: the first baby of idiopathic premature ovarian failure. *Acta Med Int* 2016; 3:19–23.
66. Gupta S, Lodha P, Karthick MS, Tandulwadkar SR. Role of autologous bone marrow-derived stem cell therapy for follicular recruitment in premature ovarian insufficiency: review of literature and a case report of world's first baby with ovarian autologous stem cell therapy in a perimenopausal woman of age 45 year. *J Human Reprod Sci* 2018; 11:125–130.
- ■ Authors reported first baby born after ovarian stem cell therapy in a 45-year-old patient.
67. Bhartiya D. Letter to the Editor: rejuvenate eggs or regenerate ovary? *Mol Cell Endocrinol* 2017; 446:111–113.
68. He Y, Chen D, Yang L, *et al.* The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9:263.
69. Gabr H, Elkheir WA, El-Gazaar A. Autologous stem cell transplantation in patients with idiopathic premature ovarian failure. *Global Congress on Tissue Engineering, Regenerative & Precision Medicine*; December 1-2, San Antonio, Texas. *J Tissue Sci Eng* 2016; 7(Suppl):3.
70. Pantos K, Nitsos N, Kokkali G, *et al.* Ovarian rejuvenation and folliculogenesis reactivation in peri-menopausal women after autologous platelet-rich plasma treatment. 32nd Annual Meeting of European Society Reproduction and Embryology (ESHRE); July 3–6, 2016; Helsinki, Finland. *Human Reprod* 2016, p. i301.
71. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008; 103:1204–1219.
72. Abedini A, Zamberlam G, Lapointe E, *et al.* WNT5a is required for normal ovarian follicle development and antagonizes gonadotropin responsiveness in granulosa cells by suppressing canonical WNT signaling. *FASEB J* 2016; 30:1534–1547.
73. Liu J, Deutsch U, Jeong J, Lobe CG. Constitutive notch signaling in adult transgenic mice inhibits bFGF-induced angiogenesis and blocks ovarian follicle development. *Genesis* 2014; 52:809–816.
74. Price CA. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *J Endocrinol* 2016; 228:R31–R43.
75. Herraiz S, Romeu M, Buigues A, *et al.* Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders. *Fertil Steril* 2018; 110:496–505.
- ■ Authors achieved the optimization of ovarian reserve and spontaneous fertility rescue after autologous stem cell ovarian transplant in a series of pregnancy rate women.
76. Salooja N, Chatterjee R, McMillan AK, *et al.* Successful pregnancies in women following single autotransplant for acute myeloid leukemia with a chemotherapy ablation protocol. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13:431–435.
77. Salooja N, Szydlo RM, Socie G, *et al.* Pregnancy outcomes after peripheral blood or bone marrow transplantation: a retrospective survey. *Lancet* 2001; 358:271–276.
78. Sanders JE, Hawley J, Levy W, *et al.* Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87:3045–3052.
79. Hershlag A, Schuster MW. Return of fertility after autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril* 2002; 77:419–421.
80. Veitia RA, Gluckman E, Fellous M, Soulier J. Recovery of female fertility after chemotherapy, irradiation, and bone marrow allograft: further evidence against massive oocyte regeneration by bone marrow-derived germline stem cells. *Stem Cells* 2007; 25:1334–1335.
81. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, *et al.* ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011; 26:1616–1624.
82. Atabekov I, Hobeika E, Sheikh U, *et al.* The role of gene therapy in premature ovarian insufficiency management. *Biomedicines* 2018; 6:102.
83. Bachelot A, Nicolas C, Bidet M, *et al.* Long-term outcome of ovarian function in women with intermittent premature ovarian insufficiency. *Clin Endocrinol* 2017; 86:223–228.

