

Cultivo de tejido ovárico para el desarrollo folicular *in vitro*: futura estrategia de restauración de la fertilidad

Ovarian tissue culture for follicular development in vitro: future fertility restoration strategy

Vitale F.

Médico Ginecólogo-Obstetra. Polo de investigación en Ginecología, Universidad Católica de Lovaina, Bruselas, Bélgica.

RESUMEN

Pregunta de estudio: ¿Es posible la restauración de la fertilidad mediante el desarrollo folicular *in vitro* de folículos primordiales (FPs) contenidos en corteza ovárica criopreservada, en pacientes con contraindicaciones para el autotrasplante de tejido ovárico?

Respuesta resumida: La técnica de desarrollo folicular *in vitro* a partir de tejido ovárico criopreservado se presenta como una estrategia prometedora, todavía en estado experimental, para este tipo de pacientes. Aunque todavía enfrenta desafíos, como la baja tasa de viabilidad folicular y la pobre eficiencia de la técnica, su potencial para generar ovocitos maduros ha sido demostrado, siendo necesario optimizar las condiciones de cultivo.

Lo que se sabe: Los tratamientos antineoplásicos en niñas prepuberales y mujeres de edad fértil causan daño gonadal, generando una disminución en la fertilidad. La criopreservación y el autotrasplante de tejido ovárico son la única opción de preservación de la fertilidad disponible en niñas prepuberales y pacientes que no pueden retrasar el inicio del tratamiento. Sin embargo, en algunos tipos de cáncer

ABSTRACT

Study question: *Is fertility restoration possible through in vitro follicle development of primordial follicles (PFs) contained in cryopreserved ovarian cortex in patients with contraindications for ovarian tissue autotransplantation?*

Summary answer: *The in vitro follicle development technique from cryopreserved ovarian tissue emerges as a promising, still experimental, strategy for such patients. Although it still faces challenges, such as a low follicle viability rate and poor technique efficiency, its potential to generate mature oocytes has been demonstrated, requiring the optimization of culture conditions.*

What is already known: *Antineoplastic treatments in prepubertal girls and childbearing-aged women cause gonadal damage, resulting in decreased fertility. Cryopreservation and autotransplantation of ovarian tissue are the only available fertility preservation options for prepubertal girls and patients who cannot delay treatment initiation. However, in certain cancer types like leukemia and Burkitt lymphoma, there is a risk of reintroducing hidden malignant*

hematológicos como leucemia y linfoma de Burkitt, existe la posibilidad de reintroducir células malignas ocultas en el tejido ovárico trasplantado. Esta clase de pacientes podrían beneficiarse con la técnica de desarrollo folicular *in vitro* de folículos. Esta técnica, todavía en estado experimental, consiste en el crecimiento *in vitro* de folículos primordiales (FP) contenidos en la corteza ovárica, hasta alcanzar folículos maduros con ovocitos en estadio de metafase II (MII).

Diseño del estudio: El artículo presenta una revisión narrativa que recopila información sobre la foliculogénesis, las vías de señalización involucradas, diversos sistemas de cultivo *in vitro*, estrategias de optimización de la activación folicular *in vitro*, y direcciones futuras de investigación para mejorar la técnica.

Resultados: Si bien ya se ha demostrado que la técnica es factible en tejido humano, todavía existen limitaciones como la baja viabilidad folicular y la pobre eficiencia de la técnica. Todavía se necesitan nuevos estudios para optimizar las condiciones de cultivo y mejorar la tasa de éxito de esta técnica. Con una optimización y un perfeccionamiento continuo, el desarrollo folicular *in vitro* podría eventualmente ofrecer una valiosa opción de restauración de la fertilidad en el entorno clínico.

Limitaciones del estudio: Aunque la técnica de desarrollo folicular *in vitro* muestra potencial, todavía presenta desafíos como la activación no controlada de folículos, la eficiencia limitada, y la falta de evaluación a largo plazo en la estabilidad genética ovocitaria y descendencia futura.

Palabras clave: Foliculogénesis, desarrollo folicular *in vitro*, preservación de la fertilidad, tejido ovárico criopreservado, activación folicular, cultivo *in vitro*.

cells into transplanted ovarian tissue. Patients in this category could benefit from the in vitro follicle development technique. This experimental procedure involves the in vitro growth of primordial follicles (PF) contained in the ovarian cortex, progressing to mature follicles with metaphase II (MII) oocytes.

Study Design: *The article presents a narrative review that compiles information on folliculogenesis, involved signaling pathways, various in vitro culture systems, strategies for optimizing in vitro follicle activation, and future research directions to enhance the technique.*

Main results: *While the feasibility of the technique in human tissue has been demonstrated, limitations such as low follicle viability and poor technique efficiency persist. Further studies are needed to optimize culture conditions and improve the success rate of this approach. With ongoing optimization and continuous refinement, in vitro follicle development could eventually offer a valuable fertility restoration option in the clinical setting.*

Limitations: *Although the in vitro follicle development technique shows great potential, it still presents challenges such as uncontrolled follicle activation, limited efficiency, and a lack of long-term evaluation of oocyte genetic stability.*

Key words: *Folliculogenesis, in vitro follicle development, fertility preservation, cryopreserved ovarian tissue, follicle activation, in vitro culture.*

Introducción

Recientes avances en tratamientos antineoplásicos han generado una notable disminución en la mortalidad en pacientes oncológicas¹. Sin embargo, las pacientes de edad fértil y niñas prepuberales que reciben esta clase de tratamiento, como la quimioterapia o la radioterapia, inevitablemente experimentarán un daño gonadal iatrogénico, con deterioro de la fertilidad y de la función endocrina^{2,3}. La quimioterapia genera un efecto citotóxico inmediato sobre las células en división, afectando en primera instancia a los folículos ováricos en crecimiento. Además, provoca inflamación tisular y destrucción de los componentes vasculares y de las células del estroma, generando eventualmente una insuficiencia ovárica prematura (IOP)⁴. Con respecto a la radioterapia, la posibilidad de causar una IOP se relaciona con la dosis de radiación utilizada. Una dosis de irradiación de 3-5 Gy, destruye el 60% de los folículos ováricos, mientras que una dosis de 5 Gy, destruye el 100% de los folículos⁵.

Existen varias estrategias de preservación de la fertilidad en pacientes que deben recibir un tratamiento gonadotóxico, como la preservación de embriones y/o de ovocitos, la transposición ovárica, y la criopreservación y el autotrasplante de tejido ovárico^{1,6}, según sea el caso a tratar. Esta última, es la única alternativa disponible para niñas en etapa prepuberal, y pacientes que no pueden retrasar el inicio de su tratamiento^{7,8}. Sin embargo, la técnica de autotrasplante de tejido ovárico conlleva el riesgo de reintroducir células malignas ocultas, especialmente en enfermedades onco-hematológicas, neuroblastoma y cáncer de mama^{9,10}. Para esta clase de pacientes, la restauración de la fertilidad solo podría lograrse de manera segura a través del desarrollo folicular *in*

vitro, generando ovocitos maduros en metafase II (ovocito MII) a partir de folículos primordiales (FP) contenidos en el tejido ovárico criopreservado.

A pesar de tratarse de una técnica alentadora, el desarrollo folicular *in vitro* se encuentra en fase experimental, ya que todavía no se comprenden completamente todos los mecanismos involucrados en la activación, crecimiento y maduración folicular. El objetivo de esta revisión es presentar una actualización sobre la técnica de cultivo de tejido ovárico para el desarrollo folicular *in vitro* como potencial estrategia de preservación de la fertilidad, sus limitaciones y posibles estrategias de optimización.

Nociones biológicas de la foliculogénesis

Estadios de desarrollo folicular

El folículo es la unidad morfo-funcional del ovario y está compuesto por un ovocito rodeado de células somáticas, como las células de la granulosa (CG)¹¹. Los folículos se clasifican en distintos estadios del desarrollo según características estructurales y funcionales en: (1) primordiales: aquellos que presentan un ovocito rodeado de una monocapa de CG aplanadas; (2) primarios: ovocito rodeado de una monocapa de CG cuboidales; (3) secundarios: ovocitos rodeados de dos o más capas de CG, y la adquisición de células especializadas llamadas células de la teca (CT); y (4) antrales: luego de la formación de un espacio de líquido intrafolicular, llamado antro, entre las multicapas de CG que conforman el complejo ovocito-cumulus (COC). Las primeras etapas del desarrollo son reguladas principalmente por factores paracrinos producidos por células somáticas circundantes, y estímulos del propio entorno intraovárico, como el crecimiento cercano de

otros folículos¹². Las etapas foliculares posteriores, son más sensibles y luego agudamente dependientes de las gonadotropinas: la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculo-estimulante (FSH)^{13,14}. Lograr una completa foliculogénesis *in vitro* consiste en la activación inicial de los FP en estado quiescente, su posterior crecimiento y progresión a través de las diferentes etapas de desarrollo, y la maduración ovocitaria final antes de que puedan ser utilizados para la fertilización *in vitro*. Muchos de estos mecanismos regulatorios de la activación folicular se desconocen, pero, dado que los FP carecen de receptores hormonales gonadotrópicos y poseen una vascularización limitada, se cree que su activación está controlada mediante vías de señalización entre células intrafoliculares y del entorno ovárico adyacente¹⁴.

Activación folicular *in vitro*

Vías de señalización de activación folicular

Vía de señalización fosfatidilinositol-3'-quinasa/protein-quinasa B (PI3K/AKT)

La vía de PI3K/AKT es una importante cascada de señalización molecular que regula una variedad de procesos celulares, incluyendo el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y el metabolismo¹⁵. Esta vía es activada por varios factores de crecimiento, como la insulina o el kit ligando, lo que promueve la conversión del fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en otro fosfolípido llamado fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). De esta forma, PIP3 atrae y fosforila a AKT y, en consecuencia, esto genera la translocación de FOXO3 (*forkhead box O3*) al citoplasma celular. Esta translocación promueve la síntesis de proteínas, provocando activación y crecimiento folicular¹⁶. mTOR

(*mammalian target of rapamycin*) es otro componente clave en esta vía de señalización. Este complejo, activado por AKT, también regula el proceso de crecimiento y activación folicular mediante síntesis de proteínas¹⁷. Estudios previos han demostrado la implicación de la vía PI3K/AKT en la regulación de la activación de los FP¹⁸. Una vez activada, estimula la síntesis de proteínas y el crecimiento celular, fomentando la activación y proliferación folicular temprana^{19,20}. PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) en contraparte, actúa como regulador negativo de esta vía, convirtiendo PIP3 nuevamente en PIP2. Estudios previos han demostrado una disminución en la señalización de PTEN al analizar perfiles transcriptómicos de ovocitos durante la transición de FPs a folículos primarios²¹.

Vía de señalización Hippo

Esta vía molecular desempeña un papel esencial en la regulación del crecimiento celular y de los tejidos²², y parece interrumpirse al extraer el tejido ovárico de su entorno fisiológico. Tras los estímulos mecánicos, los efectores moleculares YAP (*yes-associated protein 1*) y TAZ (*transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) son trasladados al núcleo, promoviendo el crecimiento y la proliferación celular²³. Cheng y colaboradores demostraron que la fragmentación de los ovarios de ratón aumentaba la polimerización del actina, lo que inhibía la señalización de Hippo, llevando finalmente al crecimiento de los folículos y los ovocitos²⁴. Del mismo modo, mediante técnicas de inmuno-tinción en tejido ovárico humano se ha demostrado una relación entre la inhibición de la señalización de Hippo y la activación folicular²⁵.

Comunicación ovocito-CG

La comunicación entre el ovocito y las CG que lo rodean involucran vías de señalización esenciales en la activación de los FP. Estudios previos sugieren que GDF9 (*Growth differentiation factor 9*) y BMP15 (*Bone morphogenetic protein 15*), dos miembros de la superfamilia TGF- β secretados específicamente por los ovocitos, podrían estar involucrados en el inicio del crecimiento folicular y la posterior transición a folículo secundario^{26,27}. Se ha documentado que, tras la activación del folículo, el ovocito reclutado inicia la secreción de GDF9 y BMP15, los cuales promueven la proliferación y expansión de las CG, causando así la transición folicular^{26,27}. De hecho, en ratones knock-out para GDF9 se observa una significativa alteración en el desarrollo folicular, lo que dificulta la progresión más allá de la etapa de folículo primario²⁸. Por otro lado, los ratones con deficiencia de BMP15 muestran subfertilidad, con tasas reducidas de ovulación y fertilización²⁹. Además, el suplemento de GDF9 y BMP15 recombinantes al cultivo *in vitro* de tejido ovárico humano promueve la activación de los FP y una mayor producción de estradiol³⁰.

Además de las vías descriptas anteriormente, la hormona anti-mülleriana (HAM) ejerce un rol regulatorio esencial sobre la reserva ovárica. La HAM es producida por las CG durante la edad reproductiva de la mujer. Su síntesis se inicia a partir de la etapa de folículo primario, y alcanza sus niveles más altos en la etapa de folículo secundario y antral³¹. Esta hormona ejerce un efecto inhibitorio en la activación de los folículos en estado latente³², con el propósito de mantener un desarrollo folicular equilibrado y coordinado. Los ratones *knock-out* para HAM exhiben un número reducido de FP y un incremento

notable de folículos secundarios y antrales pequeños³³. Asimismo, la adición de HAM al medio cultivo de tejido ovárico humano demostró inhibir la tasa de activación de los FP³⁴.

Diversos sistemas de cultivo *in vitro*

Desde el primer reporte exitoso de la producción de embriones de ratón a partir de un sistema completo de crecimiento folicular *in vitro*³⁵, varios grupos de investigación han propuesto diferentes estrategias de cultivo para imitar el proceso en humanos. El principal desafío de esta técnica *in vitro* consiste en emular de la mejor manera el microambiente intraovárico. Principalmente, se han descrito dos enfoques: el cultivo de FP aislados, y el cultivo de FP *in situ* en la corteza ovárica.

Cultivo de FP aislados

Los métodos de aislamiento folicular se dividen en tres categorías: enzimáticos³⁶⁻³⁸, mecánicos^{18,39,40}, o una combinación de ambas⁴¹⁻⁴⁵.

La digestión enzimática implica el uso de colagenasas y/o liberasas para degradar la matriz extracelular que contiene a los folículos. Esta estrategia genera una mayor cantidad de folículos en menor cantidad de tiempo en comparación con la técnica mecánica. Sin embargo, conlleva un mayor riesgo de degradación de la membrana celular y pérdida de la integridad morfológica del folículo. En contraste, el aislamiento mecánico generalmente emplea técnicas de microdissección (con agujas finas) para separar los folículos del estroma circundante. Aunque requiere más tiempo, este enfoque da como resultado una mejor conservación de la integridad y morfología folicular. Por otro lado, varios estudios⁴¹⁻⁴⁵ informaron resultados efectivos utilizando una combinación de

ambos protocolos que incluían una breve digestión enzimática, seguida de un aislamiento por microdissección individual.

En su inicio, los experimentos de crecimiento folicular *in vitro* duraban solo unos pocos días, y la estrategia de cultivo en superficies planas (2D) parecía funcionar adecuadamente. Sin embargo, a medida que se establecieron cultivos a largo plazo, el enfoque en 2D mostró limitaciones significativas, como la pérdida de comunicación entre células y la detención del crecimiento de los folículos⁴⁶. El sistema de cultivo en entorno tridimensional (3D) con la utilización de biomateriales ha ganado una atención sustancial en los últimos años debido a sus notables ventajas. Este enfoque permite una mejor imitación del entorno celular natural, promoviendo la comunicación entre células y el crecimiento de tejidos, replicando mejor las condiciones *in vivo*. Numerosos trabajos han demostrado el crecimiento y la supervivencia folicular en sistemas de cultivo que utilizan biomateriales como Matrigel, una matriz de membrana basal solubilizada o esferas de alginato^{39,41,47}.

Cultivo de FP in situ en la corteza ovárica

A pesar de los logros obtenidos con los folículos aislados, existe un consenso creciente que destaca la superioridad del enfoque de cultivo de FP *in situ* dentro de la corteza ovárica, ya que, los folículos permanecen en su entorno natural, conservando las señales bioquímicas intraováricas y su integridad estructural. Esta técnica generalmente implica el cultivo de fragmentos corticales finos, de no más de 1 mm de espesor^{40,48}. Telfer y col. fueron los primeros en reportar el desarrollo de ovocitos MII humanos a partir de FP contenidos en fragmentos de corteza ovárica, cultivados en un sistema de múltiples pasos⁴⁸. Según

este protocolo, el primer paso consiste en la activación de los FP en estado latente. El siguiente paso implica el aislamiento de aquellos folículos que hayan alcanzado el estadio secundario, mediante microdissección del estroma circundante, y un posterior cultivo individual en placas con forma de V, hasta alcanzar la etapa de folículo antral. El tercer paso implica una correcta expansión del COC, para lograr finalmente una maduración ovocitaria. Este equipo reportó la obtención de 9 ovocitos MII a partir de 160 fragmentos iniciales de corteza ovárica, en un sistema de cultivo de 21 días de duración. Si bien este estudio representa un paso esencial hacia la consecución de una completa foliculogénesis *in vitro*, también pone en manifiesto los resultados poco eficientes de esta técnica. Los autores describen una rápida activación folicular a los pocos días de iniciado el cultivo, pero también reportan bajas tasas de folículos en estadio secundario al finalizar el primer paso. Este acelerado reclutamiento folicular, posiblemente desencadenado por la liberación de los mecanismos inhibitorios del microambiente ovárico, difiere notablemente con lo que sucede fisiológicamente durante el ciclo ovárico *in vivo*. Es posibles que esta diferencia sustancial en el crecimiento folicular sea la causante de la pobre calidad y viabilidad folicular. A su vez, los autores observaron cuerpos polares aberrantes y anormales con respecto al tamaño en los ovocitos obtenidos. Cabe resaltar que futuros estudios transcriptómicos son necesarios para evaluar la integridad genética de estos ovocitos generados completamente en sistemas *in vitro*.

Composición del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo desempeña un papel fundamental en el

mantenimiento de la viabilidad, el crecimiento y la proliferación de células *in vitro*. Los medios de cultivo basales más utilizados para la foliculogénesis *in vitro* en seres humanos son el medio α MEM^{37-39, 41,44,49-55} y el medio McCoy's 5a^{40,48, 56-61}. Sumado a esto, se agregan diversos suplementos con el fin de mejorar la supervivencia y el crecimiento de los folículos. Por ejemplo, glucosa y aminoácidos, como la L-glutamina, son utilizados generalmente como fuentes de energía; se añade también insulina, transferrina y selenio para aumentar la captación de precursores metabólicos solubles en el medio; y se utilizan antibióticos, como la penicilina y la estreptomina, para prevenir el crecimiento bacteriano. Además, a menudo se añaden antioxidantes solubles como el ácido ascórbico, ya que se ha demostrado que reduce la apoptosis celular y aumenta la integridad de los folículos⁶². La suplementación con hormona estimuladora del folículo (FSH) y Activina A se utiliza con frecuencia debido a sus efectos en el crecimiento y expansión de las CG⁴⁸. Estos últimos suplementos son especialmente importantes en la segunda etapa del sistema de cultivo de múltiples pasos, donde los folículos secundarios aislados son cultivados individualmente⁴⁸. En este estadio, los folículos se vuelven dependientes de las gonadotropinas⁶³, ya que las CG comienzan a expresar receptores de FSH. Otros aditivos de cultivo han demostrado mejorar la viabilidad y desarrollo folicular, como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)⁴², y plasma rico en plaquetas, que contiene altas concentraciones de factores de crecimiento^{38,45}.

En cuanto al reemplazo del medio de cultivo, la práctica estándar es reemplazar la mitad cada dos días^{40,48}. Este procedimiento es de suma importancia, ya que

el reemplazo regular del medio permite eliminar productos de desecho celular acumulados y suministrar los nutrientes esenciales necesarios para mantener la viabilidad y funcionalidad celular.

Estrategias de optimización de la activación folicular *in vitro*

La activación folicular ocurre de forma espontánea después de unos pocos días de cultivo *in vitro*^{19,40,48,60,61}. Se cree que esto puede deberse a una disrupción de los mecanismos de supresión de la activación folicular luego de que el fragmento cortical es extraído de su entorno natural⁶⁴. Esto provoca una desregulada activación *in vitro* que contrasta fuertemente con el proceso fisiológico natural, en el que los FP son reclutadas gradualmente. Esto, sin duda, plantea dudas sobre la calidad y la integridad genómica de los folículos derivados del desarrollo *in vitro*. De hecho, estudios previos^{40,48} observaron que, a pesar de esta activación espontánea *in vitro*, solo una proporción limitada de FP es capaz de avanzar a la siguiente etapa de crecimiento, mientras que la mayoría enfrenta la muerte celular programada o detención del desarrollo. Aparentemente, no todos los folículos activados logran crecer y desarrollarse hasta etapas posteriores⁴⁸. Aún es difícil determinar si el problema radica en la activación inicial no restringida o en alguna etapa posterior del desarrollo.

En los últimos años, numerosas investigaciones se han centrado en aumentar la activación *in vitro* de los folículos utilizando agentes farmacológicos con el fin de mejorar la eficiencia del cultivo de tejido ovárico. Por ejemplo, la exposición breve a dosis bajas de inhibidores de PTEN como el Bisperoxovanadio(pic) [bpV(pic)] o el Bisperoxovanadio(HOpic) [bpV(HOpic)] mejoró la activación y el crecimiento de

las FP *in vitro* en humanos^{18,65} y aumentó la secreción de estradiol⁶⁵. Además, Kawamura y col. documentaron embarazos luego de autotransplante de tejido ovárico previamente expuesto a un inhibidor de PTEN en pacientes con IOP⁶⁶. Sin embargo, forzar la activación de los folículos de esta manera podría ser perjudicial para la salud de los mismos. PTEN desempeña un papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica^{67,68}. Estudios previos demostraron que la inhibición de PTEN provocaba un mayor daño al ADN y una capacidad de reparación del ADN deficiente en folículos bovinos⁶⁹ además de aumentar la tasa de anormalidad histo-morfológica, como la pérdida de contactos entre las CG y el oocito, defectos en la esteroidogénesis y una baja supervivencia de los folículos en crecimiento^{18,55,59}.

A su vez, otro grupo de investigadores han planteado la hipótesis de que un sistema de cultivo *in vitro* ideal debería restringir la activación masiva de los folículos para imitar el entorno intraovárico natural. Se ha utilizado la inhibición farmacológica de mTOR, un efector posterior de la vía PI3K/AKT, para atenuar la activación *in vitro* de los folículos. La exposición a Rapamicina, un inhibidor de mTORC1, mostró altas tasas de pérdida de ovocitos y un patrón de “folículo vacío” en el cultivo de tejido ovárico⁵⁶. Sorprendentemente, se observaron mejores resultados con everolimus (EVE), un análogo de la rapamicina. EVE ha sido recientemente documentado como un agente protector que mantiene la quiescencia de los FP y evita la activación espontánea⁵⁹. Además, la adición de HAM al cultivo de tejido ovárico podría servir como un enfoque valioso para controlar el reclutamiento folicular masivo. Recientemente, se ha informado que la exposición de teji-

do ovárico humano a HAM recombinante redujo significativamente la tasa de activación folicular⁷⁰.

La tensión de oxígeno (O₂) es otro factor ambiental crucial que afecta los resultados del cultivo *in vitro*. Es difícil determinar la tensión óptima de O₂ para el cultivo folicular. Se estima que los FP quiescentes residen en la corteza ovárica dentro de una tensión de O₂ fisiológica que oscila entre el 2% y el 8%⁷¹. Una tensión elevada de O₂ puede provocar una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conduce a daños por estrés oxidativo y disfunción celular. En consecuencia, la exposición de los FPs a una tensión de O₂ por encima de los niveles fisiológicos podría resultar en un mayor estrés celular y una menor tasa de viabilidad. De acuerdo con estos datos, un estudio informó que el tejido ovárico cultivado por 6 días a baja tensión de O₂ (5%) demostró una menor tasa de apoptosis folicular, principalmente debido a menos daño por estrés oxidativo y menos roturas de doble cadena de ADN⁶⁰ en comparación con el cultivo al 20% de tensión de O₂. Además, se ha demostrado que la hipoxia induce el estado de reposo en los ovocitos a través de FOXO3, un efector de la vía de señalización PI3K/AKT⁷², por lo que el cultivo *in vitro* a una tensión de O₂ atmosférico podría ser la causante de esta activación espontánea masiva.

Si bien la regulación de la activación folicular *in vitro* parecería una alternativa para optimizar los resultados del cultivo, no debería subestimarse el deterioro y la afectación folicular previamente descritos. Asimismo, aún no se han evaluado los impactos a largo plazo en la inestabilidad genética ovocitaria y la descendencia futura. Aun se requieren investigaciones adicionales acerca de cómo la manipulación

de la activación *in vitro* podría afectar la calidad de los ovocitos y futuros embriones.

Direcciones futuras

Nuevas investigaciones apuntan a optimizar el ambiente de cultivo *in vitro* utilizando técnicas como modelos microfluídicos dinámicos⁷³⁻⁷⁵. Este enfoque tiene como objetivo proporcionar un flujo constante de medio de cultivo alrededor del tejido, promoviendo un intercambio continuo de metabolitos y nutrientes, imitando el entorno ovárico fisiológico. Algunos estudios ya han demostrado resultados beneficiosos utilizando este método en otras tecnologías dentro de la asistencia reproductiva, como el cultivo testicular⁷⁵ y modelos de espermatogénesis *in vitro*⁷⁴.

De manera similar, los enfoques de co-cultivo han mostrado una mejora sustancial en los resultados. Diferentes tipos de células madre mesenquimales (CMM), como las derivadas de médula ósea o del tejido adiposo, han sido utilizadas en sistemas de co-cultivo junto con tejido ovárico, mostrando un efecto proliferativo y anti-apoptótico sobre los folículos ováricos⁷⁶. Las CMM ejercen sus funciones

biológicas paracrinas a través de la liberación de factores de crecimiento y citoquinas dentro de vesículas llamadas exosomas⁷⁷. Investigaciones futuras deberían centrarse en optimizar estrategias de recolección de exosomas derivados de CMM para ser agregados como aditivos en medios de cultivo.

Conclusiones

El desarrollo folicular *in vitro* a partir de tejido ovárico criopreservado se plantea actualmente como una estrategia de notable potencial para la restauración de la fertilidad en pacientes con alto riesgo de reintroducción de células malignas en el autotransplante. A pesar de los desafíos actuales asociados con la técnica *in vitro*, varios estudios han demostrado la capacidad de esta técnica para generar ovocitos MII a partir de folículos en etapas tempranas. Sin embargo, todavía se necesitan nuevos estudios para optimizar las condiciones de cultivo y mejorar la tasa de éxito de esta técnica. Con una optimización y un perfeccionamiento continuo, el desarrollo folicular *in vitro* podría eventualmente ofrecer una valiosa opción de restauración de la fertilidad en el entorno clínico.

REFERENCIAS

1. J. Donnez, M.-M. Dolmans, Fertility Preservation in Women. *N Engl J Med* 377, 1657–1665 (2017).
2. K. Schmidt, E. Larsen, C. Andersen, A. Andersen, Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease: Fertility preserving methods in girls with cancer. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 117, 163–174 (2010).
3. L. A. Kondapalli, et al., Quality of life in female cancer survivors: is it related to ovarian reserve? *Qual Life Res* 23, 585–592 (2014).
4. N. Spears, et al., Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Human Reproduction Update* 25, 673–693 (2019).
5. K. D. Dinas, Impact of Breast Cancer Treatment on Fertility. *Adv Exp Med Biol* 1252, 175–179 (2020).
6. M.-M. Dolmans, et al., European REcommendations for female FERtility preservation (EU-REFER): A joint collaboration between oncologists and fertility special-

- ists. Crit Rev Oncol Hematol 138, 233–240 (2019).
7. W. H. B. Wallace, T. W. Kelsey, R. A. Anderson, Fertility preservation in pre-pubertal girls with cancer: the role of ovarian tissue cryopreservation. Fertility and Sterility 105, 6–12 (2016).
 8. D. Shai, et al., Ovaries of patients recently treated with alkylating agent chemotherapy indicate the presence of acute follicle activation, elucidating its role among other proposed mechanisms of follicle loss. Fertility and Sterility 115, 1239–1249 (2021).
 9. M.-M. Dolmans, V. Luyckx, J. Donnez, C. Y. Andersen, T. Greve, Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. Fertility and Sterility 99, 1514–1522 (2013).
 10. R. Abir, et al., Ovarian minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia. Reprod Biomed Online 28, 255–260 (2014).
 11. A. Gougeon, Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. Hum Reprod 1, 81–87 (1986).
 12. L. Li, X. Shi, Y. Shi, Z. Wang, The Signaling Pathways Involved in Ovarian Follicle Development. Front Physiol 12, 730196 (2021).
 13. K. Oktay, D. Briggs, R. G. Gosden, Ontogeny of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Expression in Isolated Human Ovarian Follicles 1. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 82, 3748–3751 (1997).
 14. H. Kishi, Y. Kitahara, F. Imai, K. Nakao, H. Suwa, Expression of the gonadotropin receptors during follicular development. Reprod Med Biol 17, 11–19 (2018).
 15. B. D. Manning, L. C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell 129, 1261–1274 (2007).
 16. D. H. Castrillon, L. Miao, R. Kollipara, J. W. Horner, R. A. DePinho, Suppression of Ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a. Science 301, 215–218 (2003).
 17. D. Adhikari, et al., Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. Hum Mol Genet 19, 397–410 (2010).
 18. M. McLaughlin, H. L. Kinnell, R. A. Anderson, E. E. Telfer, Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary *in vitro* results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. Molecular Human Reproduction 20, 736–744 (2014).
 19. C. Terren, M. Nisolle, C. Munaut, Pharmacological inhibition of the PI3K/PTEN/Akt and mTOR signalling pathways limits follicle activation induced by ovarian cryopreservation and *in vitro* culture. J Ovarian Res 14, 95 (2021).
 20. R. Masciangelo, et al., Role of the PI3K and Hippo pathways in follicle activation after grafting of human ovarian tissue. J Assist Reprod Genet 37, 101–108 (2020).
 21. E. H. Ernst, et al., Dormancy and activation of human oocytes from primordial and primary follicles: molecular clues to oocyte regulation. Human Reproduction 32, 1684–1700 (2017).
 22. D. Pan, Hippo signaling in organ size control. Genes Dev. 21, 886–897 (2007).
 23. A. J. W. Hsueh, K. Kawamura, Y. Cheng, B. C. J. M. Fauser, Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. Endocrine Reviews 36, 1–24 (2015).
 24. Y. Cheng, et al., Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. FASEB j. 29, 2423–2430 (2015).
 25. C. De Roo, S. Lierman, K. Tilleman, P. De Sutter, In-vitro fragmentation of ovarian tissue activates primordial follicles through the Hippo pathway. Hum Reprod Open 2020, hoaa048 (2020).
 26. R. B. Gilchrist, M. Lane, J. G. Thompson, Oocyte-secreted factors: regulators of cumu-

- lus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update* 14, 159–177 (2008).
27. T. S. Hussein, J. G. Thompson, R. B. Gilchrist, Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology* 296, 514–521 (2006).
 28. J. Dong, et al., Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383, 531–535 (1996).
 29. C. Yan, et al., Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. *Molecular Endocrinology* 15, 854–866 (2001).
 30. A. Kedem, et al., Growth Differentiating Factor 9 (GDF9) and Bone Morphogenetic Protein 15 both Activate Development of Human Primordial Follicles in vitro , with Seemingly More Beneficial Effects of GDF9. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96, E1246–E1254 (2011).
 31. C. Weenen, et al., Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 10, 77–83 (2004).
 32. M.-C. Meinsohn, et al., Single-cell sequencing reveals suppressive transcriptional programs regulated by MIS/AMH in neonatal ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2100920118 (2021).
 33. A. L. Durlinger, et al., Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140, 5789–5796 (1999).
 34. I. B. Carlsson, et al., Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod* 21, 2223–2227 (2006).
 35. J. J. Eppig, Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction* 54, 197–207 (1996).
 36. C. A. Amorim, A. Van Langendonck, A. David, M.-M. Dolmans, J. Donnez, Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod* 24, 92–99 (2009).
 37. R. Abir, Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Human Reproduction* 14, 1299–1301 (1999).
 38. L. Hosseini, et al., Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. *Reprod Biomed Online* 35, 343–350 (2017).
 39. S. Xiao, et al., In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. *Sci Rep* 5, 17323 (2015).
 40. E. E. Telfer, M. McLaughlin, C. Ding, K. J. Thong, A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction* 23, 1151–1158 (2008).
 41. M. Xu, et al., In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Hum Reprod* 24, 2531–2540 (2009).
 42. T. Wang, et al., Basic fibroblast growth factor promotes the development of human ovarian early follicles during growth in vitro. *Hum Reprod* 29, 568–576 (2014).
 43. X. Xia, et al., Mesenchymal Stem Cells Facilitate In Vitro Development of Human Pre-antral Follicle. *Reprod. Sci.* 22, 1367–1376 (2015).
 44. M.-C. Chiti, et al., Ovarian extracellular matrix-based hydrogel for human ovarian follicle survival in vivo: A pilot work. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 110, 1012–1022 (2022).
 45. C. Subiran Adrados, et al., Human platelet lysate improves the growth and survival of cultured human pre-antral follicles. *Reprod Biomed Online* 47, 103256 (2023).
 46. L. J. Green, A. Shikanov, In vitro culture methods of preantral follicles. *Theriogenology* 86, 229–238 (2016).

47. H. Yin, S. G. Kristensen, H. Jiang, A. Rasmussen, C. Y. Andersen, Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture. *Hum Reprod* 31, 1531–1539 (2016).
48. M. McLaughlin, D. F. Albertini, W. H. B. Wallace, R. A. Anderson, E. E. Telfer, Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol Hum Reprod* 24, 135–142 (2018).
49. A. Camboni, et al., Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. *Cryobiology* 67, 64–69 (2013).
50. M. M. Laronda, et al., Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. *J Assist Reprod Genet* 31, 1013–1028 (2014).
51. R. Abir, et al., Mechanical isolation and *in vitro* growth of preantral and small antral human follicles. *Fertil Steril* 68, 682–688 (1997).
52. O. Hovatta, R. Silye, R. Abir, T. Krausz, R. M. Winston, Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod* 12, 1032–1036 (1997).
53. J. G. Hreinsson, et al., Growth Differentiation Factor-9 Promotes the Growth, Development, and Survival of Human Ovarian Follicles in Organ Culture. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 316–321 (2002).
54. J. E. Scott, I. B. Carlsson, B. D. Bavister, O. Hovatta, Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions. *Reprod Biomed Online* 9, 287–293 (2004).
55. G. Lerer-Serfaty, et al., Attempted application of bioengineered/biosynthetic supporting matrices with phosphatidylinositol-triphosphate-enhancing substances to organ culture of human primordial follicles. *J Assist Reprod Genet* 30, 1279–1288 (2013).
56. M. McLaughlin, et al., mTOR kinase inhibition results in oocyte loss characterized by empty follicles in human ovarian cortical strips cultured *in vitro*. *Fertility and Sterility* 96, 1154–1159.e1 (2011).
57. F. Khosravi, et al., *In vitro* development of human primordial follicles to preantral stage after vitrification. *J Assist Reprod Genet* 30, 1397–1406 (2013).
58. E. Asadi, et al., Ovarian tissue culture in the presence of VEGF and fetuin stimulates follicle growth and steroidogenesis. *J Endocrinol* 232, 205–219 (2017).
59. J. Grosbois, I. Demeestere, Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during *in vitro* human follicle activation. *Human Reproduction* 33, 1705–1714 (2018).
60. F. Vitale, et al., Importance of oxygen tension in human ovarian tissue *in vitro* culture. *Human Reproduction* 38, 1538–1546 (2023).
61. C. Hossay, et al., Follicle outcomes in human ovarian tissue: effect of freezing, culture, and grafting. *Fertility and Sterility* 119, 135–145 (2023).
62. D. Tagler, et al., Promoting extracellular matrix remodeling via ascorbic acid enhances the survival of primary ovarian follicles encapsulated in alginate hydrogels. *Biotechnol Bioeng* 111, 1417–1429 (2014).
63. D. Bhartiya, H. Patel, An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing conundrums. *J Ovarian Res* 14, 144 (2021).
64. G. Nagamatsu, S. Shimamoto, N. Hamazaki, Y. Nishimura, K. Hayashi, Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes. *Sci Adv* 5, eaav9960 (2019).
65. E. Novella-Maestre, S. Herraiz, B. Rodríguez-Iglesias, C. Díaz-García, A. Pellicer, Short-Term PTEN Inhibition Improves *In Vitro* Activation of Primordial Follicles,

- Preserves Follicular Viability, and Restores AMH Levels in Cryopreserved Ovarian Tissue From Cancer Patients. *PLoS One* 10, e0127786 (2015).
66. J. Li, et al., Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 10280–10284 (2010).
 67. W. H. Shen, et al., Essential Role for Nuclear PTEN in Maintaining Chromosomal Integrity. *Cell* 128, 157–170 (2007).
 68. K. Jagarlamudi, et al., Oocyte-Specific Deletion of Pten in Mice Reveals a Stage-Specific Function of PTEN/PI3K Signaling in Oocytes in Controlling Follicular Activation. *PLoS ONE* 4, e6186 (2009).
 69. M. Maidarti, Y. L. Clarkson, M. McLaughlin, R. A. Anderson, E. E. Telfer, Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. *Human Reproduction* 34, 297–307 (2019).
 70. I. B. Carlsson, et al., Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod* 21, 2223–2227 (2006).
 71. G. P. Redding, J. E. Bronlund, A. L. Hart, Mathematical modelling of oxygen transport-limited follicle growth. *Reproduction* 133, 1095–1106 (2007).
 72. S. Shimamoto, et al., Hypoxia induces the dormant state in oocytes through expression of Foxo3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 12321–12326 (2019).
 73. J. B. Nagashima, R. El Assal, N. Songsasen, U. Demirci, Evaluation of an ovary-on-a-chip in large mammalian models: Species specificity and influence of follicle isolation status. *J Tissue Eng Regen Med* 12, e1926–e1935 (2018).
 74. S. Önen, et al., A pumpless monolayer microfluidic device based on mesenchymal stem cell-conditioned medium promotes neonatal mouse in vitro spermatogenesis. *Stem Cell Res Ther* 14, 127 (2023).
 75. S. Sharma, B. Venzac, T. Burgers, S. Le Gac, S. Schlatt, Microfluidics in male reproduction: is ex vivo culture of primate testis tissue a future strategy for ART or toxicology research? *Molecular Human Reproduction* 26, 179–192 (2020).
 76. M. Hosseini, et al., Improvement of in situ Follicular Activation and Early Development in Cryopreserved Human Ovarian Cortical Tissue by Co-Culturing with Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs* 208, 48–58 (2019).
 77. V. Smolinská, M. Boháč, L. Danišovič, Current status of the applications of conditioned media derived from mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Physiol Res* 72, S233–S245 (2023).