



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**ESTUDIO DE LA ESPERMATOGÉNESIS
EN MODELOS *IN VITRO***

**STUDY OF SPERMATOGENESIS IN *IN
VITRO* MODELS**

Autora: Noelia Serrano Menéndez

Tutoras: M.^a Paz Herráez Ortega y Silvia González Rojo

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2022

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Las células madre espermatogoniales.....	1
1.2. Diversidad de la organización testicular.....	2
1.2.1. Organización testicular en mamíferos.....	3
1.2.2. Organización testicular en peces.....	4
1.3. El proceso espermatogénico.....	6
1.3.1. El proceso espermatogénico en mamíferos.....	6
1.3.2. El proceso espermatogénico en peces.....	8
1.4. Regulación de la espermatogénesis.....	9
2. ESPERMATOGÉNESIS <i>IN VITRO</i>: MODELOS DE ESTUDIO.....	10
2.1. Cultivo de órgano o tejido.....	11
2.2. Sistemas de cultivo celular en dos dimensiones.....	14
2.3. Sistemas de cultivo celular en tres dimensiones.....	16
3. CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD.....	18
4. PRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD.....	22
5. CONCLUSIONES.....	25
6. REFERENCIAS.....	26

RESUMEN

La espermatogénesis es el proceso de diferenciación de las células madre espermatogoniales en los espermatozoides, los gametos masculinos, en los testículos. Aunque es un proceso bastante conservado en los vertebrados, existen diferencias entre especies que se hacen evidentes tanto en la anatomía y la organización testicular, como en la fisiología, estrictamente regulada. Desde principios del siglo XX, existe un interés creciente en la replicación del proceso espermatogénico *in vitro* mediante el establecimiento de sistemas de cultivo de tejido, cultivo de suspensiones celulares en monocapa o la formación de estructuras tridimensionales artificiales. Conseguir el desarrollo de espermatozoides en el laboratorio tiene numerosas aplicaciones potenciales en el ámbito de la investigación básica y en la clínica. Actualmente, muchas investigaciones se dirigen al desarrollo de modelos de espermatogénesis *in vitro* para la conservación de la biodiversidad en especies ganaderas o especies amenazadas, y para la preservación de la fertilidad en pacientes preadolescentes que van a someterse a tratamientos oncológicos que pueden poner en riesgo su fertilidad. A pesar de que ha habido avances importantes en especies modelo como el ratón, todavía se requiere un mayor estudio para su aplicación en el futuro.

Palabras clave: biodiversidad, células germinales, células madre espermatogoniales, espermatozoides, fertilidad, tejido testicular

ABSTRACT

Spermatogenesis is the process of differentiation of spermatogonial stem cells into spermatozoa, the male gametes, in the testes. Although it is a conserved process in vertebrates, there are differences between species that are evident both in the anatomy and testicular organization, as well as in the strictly regulated physiology. Since the beginning of the 20th century, there has been a growing interest in the replication of the spermatogenic process *in vitro* through the establishment of tissue culture, monolayer cell suspensions culture systems or the formation of artificial three-dimensional structures. Achieving the development of spermatozoa in the laboratory has got numerous potential applications in the field of basic research and in the clinic. Nowadays, much research is directed at the development of *in vitro* spermatogenesis models for the conservation of biodiversity in livestock or endangered species and for the preservation of fertility in preadolescent patients, who are going to undergo oncological treatments that may put their fertility at risk. Although there have been important advances species like mouse, further study is still required for its application in the future.

Key words: biodiversity, fertility, germ cell, spermatogonial stem cells, spermatozoa, testis tissue

ABREVIATURAS

3-LGS	sistema de gradiente de tres capas
DMSO	dimetil sulfóxido
EGP	factor de crecimiento epidérmico
FBS	suero fetal bovino
FSH	hormona estimulante del folículo
GDNF	factor neurotrófico derivado de la línea celular glial
GnRH	hormona liberadora de gonadotropina
ICSI	inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IGF-1	factor de crecimiento similar a la insulina 1
LH	hormona luteinizante
MCS	sistema de metilcelulosa
MEM	medio mínimo esencial
PGCs	células germinales primordiales
PModS	factor peritubular que modula la función de las células de Sertoli
ROSI	inyección de espermátidas redondas
SACS	sistema de cultivo en agar blando
SCF	factor de células madre
SRY	región Y determinante del sexo
SSC	células madre espermatogoniales
TGF- α	factor de crecimiento transformante alfa

1. LA FORMACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

La espermatogénesis se define como el proceso de formación de las células germinales masculinas, los espermatozoides, mediante una serie de eventos moleculares que conducen a la proliferación y diferenciación de células madre espermatogoniales (SSC, *spermatogonial stem cells*) (Cannarella *et al.*, 2020). Es un proceso complejo y dinámico que tiene lugar en los testículos y que requiere numerosas interacciones entre diferentes tipos de células, tanto somáticas como germinales, hormonas, factores de crecimiento y otras señales (Ibtisham y Honaramooz, 2020).

En condiciones normales comienza en la pubertad y se puede extender a lo largo de toda la vida del individuo (Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021). La espermatogénesis tiene un papel fundamental en la continuidad de la línea germinal masculina al generar espermatozoides haploides que, una vez ha tenido lugar la fecundación producen descendencia para la siguiente generación (Kubota y Brinster, 2018).

La espermatogénesis comprende tres fases esenciales: la fase proliferativa, la fase meiótica y la fase de diferenciación o espermiogénesis (Cannarella *et al.*, 2020). En la fase proliferativa se generan espermatogonias a partir de las SSC por mitosis continuas y sucesivas y, en última instancia, espermatoцитos primarios. Los espermatoцитos primarios, células diploides, entran en la fase meiótica, en la que se recombina el material genético, y da lugar a las espermátidas, células haploides. Estas se transforman en espermatozoides en la fase de diferenciación (Kubota y Brinster, 2018).

En principio es un proceso bastante conservado en los vertebrados. Excepto en la fase mitótica, en la que el número de generaciones de espermatogonias es variable entre especies, pero está determinado genéticamente dentro de las mismas, las otras dos fases presentan similitudes entre diferentes especies (Schulz *et al.*, 2010). Sin embargo, las adaptaciones de la morfología testicular son bastante variables dependiendo de la historia evolutiva y del contexto ecológico actual de cada especie, por lo que existen distintas características anatómicas testiculares que forman el microambiente para el desarrollo de los gametos masculinos (Ramm *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2019).

1.1. Las células madre espermatogoniales

Las SSC son una subpoblación pequeña y heterogénea de células que se apoyan en la membrana basal de los túbulos seminíferos en los testículos (Ibtisham y Honaramooz, 2020). Son espermatogonias indiferenciadas que se caracterizan por tener la capacidad de autorrenovación para mantener el conjunto de células y la capacidad de diferenciación a otros

estadios celulares con el fin de permitir el desarrollo continuo de espermatozoides (Fayomi y Orwig, 2018). Permanecen latentes o se autorrenuevan lentamente durante la infancia, se diferencian de forma limitada en la pubertad temprana y ya en la edad adulta, llegan a establecer un equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación (Du *et al.*, 2021).

Las SSC se originan a partir de las células germinales primordiales (PGCs, *primordial germ cells*), las células precursoras del linaje de las células de la línea germinal, tanto en embriones masculinos como en femeninos (Ibtisham y Honaramooz, 2020). Durante el desarrollo embrionario, colonizan las gónadas indefinidas en desarrollo, en las que tiene lugar la determinación del sexo (Law *et al.*, 2019; Ibtisham y Honaramooz, 2020). Se ha sugerido que mediadores como el factor de células madre (SCF, *stem cell factor*) y la fibronectina, que se expresan a lo largo de la ruta migratoria, y moléculas de adhesión expresadas por las PGCs son responsables de su orientación antes de la formación del sistema nervioso. Una vez que se ha desarrollado, las células de Schwann secretarían ácido lisofosfatídico que también participaría en la atracción de las PGCs (Mäkelä *et al.*, 2019).

En la gónada indiferenciada, la expresión de la región Y determinante del sexo (SRY, *sex-determining region Y*), presente en el cromosoma Y, en una subpoblación de células somáticas, provoca el inicio de una cascada de señalización que conduce a la diferenciación gonadal específica del macho; se forman las proespermatogonias (Law *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019). Las proespermatogonias proliferan y entran en una fase de reposo (Law *et al.*, 2019). Las PGCs pasan a denominarse gonocitos y, una vez que ocupan su nicho definitivo, espermatogonias (Sharma *et al.*, 2019).

1.2. Diversidad de la organización testicular

Al comparar diferentes familias de vertebrados, se hace evidente que la anatomía, el tamaño relativo y la ubicación de los testículos difieren mucho, a veces incluso entre especies estrechamente relacionadas. En peces y anfibios, los testículos se presentan como lóbulos alargados que se extienden a ambos lados de la cavidad abdominal y que están unidos al mesenterio dorsal. Están conectados mediante conductos eferentes a la parte craneal del riñón adyacente para facilitar el transporte de espermatozoides a través de conductos especializados de los sistemas renales. Por el contrario, los testículos de los mamíferos son, generalmente, de forma elíptica y pueden ubicarse permanentemente en la cavidad abdominal (como en elefantes y mamíferos marinos) o en el escroto (como en el hombre), lo cual proporciona una temperatura menor que la temperatura corporal. Además, el testículo de los mamíferos está encerrado por

una cápsula fibrosa y muy vascularizada denominada túnica albugínea, que está conectada con los músculos retractores (Schlatt y Ehmcke, 2014).

En función de la organización, los testículos de los vertebrados se pueden clasificar en dos tipos: tubulares, en reptiles, aves y mamíferos, y císticos, en peces y anfibios (Ramm *et al.*, 2014). En todos, los testículos presentan una estructura compartimentada; se componen del compartimento tubular, que alberga el epitelio germinal, y el intertubular o intersticial, responsable del suministro de sangre, las respuestas inmunológicas y la producción de hormonas esteroideas (Schulz *et al.*, 2010).

1.2.1. Organización testicular en mamíferos

En los mamíferos, los testículos se dividen en lóbulos que constan de los túbulos seminíferos rodeados de tejido intersticial. Los túbulos seminíferos están delimitados por una lámina basal y una cubierta de células mioideas peritubulares, células contráctiles que impulsan a los espermatozoides que se van formando hacia el epidídimo. El epitelio germinal está compuesto por las células de Sertoli, adheridas al lado interno de la lámina basal, y células germinales en diferentes etapas de desarrollo (Ramm *et al.*, 2014). A medida que se van diferenciando, van migrando desde la membrana basal a la luz del túbulo seminífero, donde se localizan los espermatozoides maduros una vez formados (**Figura 1**) (Varuzhanyan y Chan, 2020).

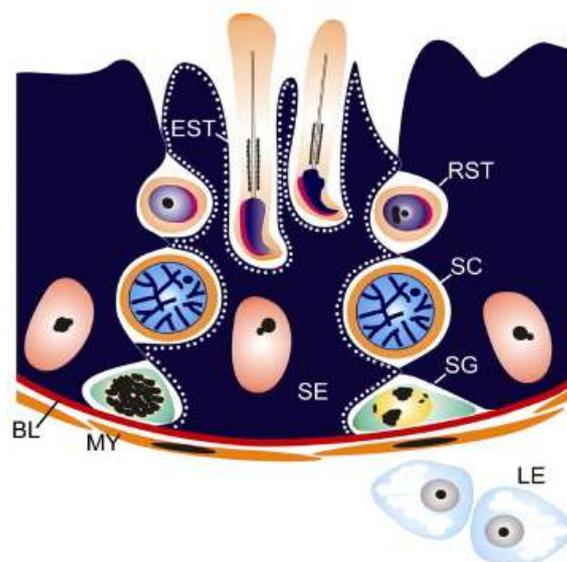


Figura 1. Estructura del testículo de mamíferos. El epitelio germinal está delimitado por la lámina basal (BL) y las células mioideas peritubulares (MY) y contiene células de Sertoli (SE) y germinales: espermátidas (SG), espermátidas (SC), espermátidas redondas (RST) y espermátidas alargadas (EST). Las células de Leydig (LE) se localizan fuera del túbulo seminífero (Schulz *et al.*, 2010).

Las células de Sertoli proporcionan el ambiente adecuado para el desarrollo de los espermatozoides, dan un soporte estructural y nutritivo y liberan factores que actúan de forma

paracrina en las células germinales (Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021). Un ejemplo es el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF, *glial cell line-derived neurotrophic factor*), que junto con otros factores de crecimiento son inducidos por la hormona estimulante del folículo (FSH, *follicle stimulating hormone*) y promueven la diferenciación de las espermatogonias *A-aligned* en espermatogonias A₁ (Cannarella *et al.*, 2020).

Las células de Sertoli establecen uniones con las células germinales de tres tipos: especializaciones ectoplasmáticas, desmosomas y uniones *gap*; y uniones estrechas entre sí (Mruk y Cheng, 2015). Estas últimas constituyen la barrera hematotesticular que interrumpe el paso de agua, solutos y otras moléculas grandes por el espacio paracelular, y restringe el movimiento de proteínas y lípidos entre los dominios apical y basolateral. Es esencial para la espermatogénesis puesto que impide la producción de anticuerpos contra los espermatozoides, que serían reconocidos como extraños, y limita la entrada de compuestos nocivos. (Miller y Cherrington, 2018).

A diferencia de las células de Sertoli, las células de Leydig se localizan en el tejido intersticial, fuera de los túbulos seminíferos, y su función consiste en proporcionar la testosterona necesaria para impulsar la espermatogénesis (Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021). En mamíferos no roedores, estas junto con las células mioides peritubulares producen factores paracrinos como el factor peritubular que modula la función de las células de Sertoli (PModS, *peritubular factor that modulates Sertoli cell function*), que controla los efectos de la testosterona en las células de Sertoli, alterando, a su vez, la secreción de transferrina (proteína implicada en el transporte de hierro a las células germinales) e inhibina (hormona esteroidea que promueve la espermatogénesis), fundamentales para el crecimiento, función y diferenciación de las células germinales (Reis *et al.*, 2015; Ibtisham y Honaramooz, 2020; Shah *et al.*, 2021).

1.2.2. Organización testicular en peces

Los peces constituyen el grupo más diverso de vertebrados, sin embargo el conocimiento sobre la espermatogénesis es más reducido y se limita a una serie de especies empleadas en la investigación básica y/o en la biotecnología acuícola, como el salmón, la tilapia, la trucha y el pez cebra (Schulz *et al.*, 2010).

A diferencia de los mamíferos, la espermatogénesis en peces es de tipo cístico (**Figura 2**). La unidad funcional del epitelio testicular es un ciste espermatogénico, en el que las extensiones citoplasmáticas de una o dos células de Sertoli envuelven a un grupo de células germinales, que derivan de una sola espermatogonia y se desarrollan sincrónicamente como un clon

interconectadas por puentes citoplasmáticos. El número de espermátidas por ciste depende del número de espermatogonias y este, a su vez, del número de ciclos mitóticos que se lleven a cabo, el cual es específico de cada especie. Además, otra característica es que el desarrollo de cada ciste respecto al resto, es asincrónico (Nóbrega *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2010; Lacerda *et al.*, 2014).

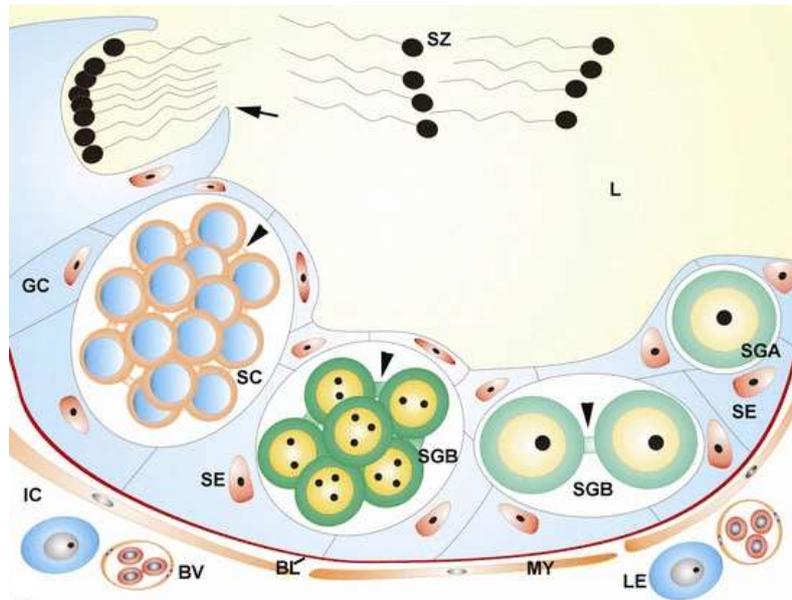


Figura 2. Estructura del testículo de peces. Se divide en compartimento tubular o germinal (GC) y compartimento intersticial o intertubular (IC). La lámina basal (BL) y las células mieloideas peritubulares (MY) delimitan el epitelio germinal, que se organiza en cistes. Los cistes se forman a partir de una sola espermatogonia (espermatogonia primaria o tipo A, (SGA) rodeada por células de Sertoli (SE). También se representan cistes de espermatogonias secundarias o tipo B (SGB) y espermatocitos (SC), interconectados por puentes citoplasmáticos (flecha). La liberación de los espermatozoides (SZ) supone la apertura de los cistes (Nóbrega *et al.*, 2010).

En los peces teleósteos el testículo cístico puede adquirir diferentes configuraciones en función de la distribución de las espermatogonias: distribución de espermatogonias restringida y distribución no restringida. Respecto a la primera, los cistes espermatogénicos comienzan a desarrollarse en el extremo distal del compartimento germinal y a medida que las células se dividen, migran hacia los conductos espermáticos, ubicados en la parte central de los testículos, donde se abren para liberar los espermatozoides en un proceso conocido como espermiación. Esta disposición se encuentra en los teleósteos superiores, como en los órdenes Atheriniformes, Cyprinodontiformes y Beloniformes. En cambio, en la distribución de espermatogonias no restringida, estas se disponen a lo largo del compartimento germinal por todo el testículo y los cistes no se desplazan durante su desarrollo. Es una configuración más primitiva que se observa en grupos de teleósteos menos evolucionados como en los órdenes Cypriniformes, Characiformes y Salmoniformes. Además, en algunas especies también existen configuraciones intermedias entre la distribución de espermatogonias restringida y la no restringida (Schulz *et al.*, 2010).

En cuanto a la barrera hematotesticular, a diferencia de los mamíferos, en peces se establece después de la meiosis y solo las células germinales haploides están protegidas del compartimento vascular y del sistema inmunitario (Schulz *et al.*, 2010).

Con relación a las SSC, en peces no se encuentran directamente sobre la membrana basal, sino que están de manera individual rodeadas por prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli (Xie *et al.*, 2020).

1.3. El proceso espermatogénico

1.3.1. El proceso espermatogénico en mamíferos

Los estudios más completos sobre espermatogénesis se han realizado en mamíferos. Estos han revelado que a pesar de ser un proceso bastante similar entre diferentes especies, existen diferencias interespecíficas notables en la fisiología de las espermatogonias (**Figura 3**) (Ramm *et al.*, 2014).

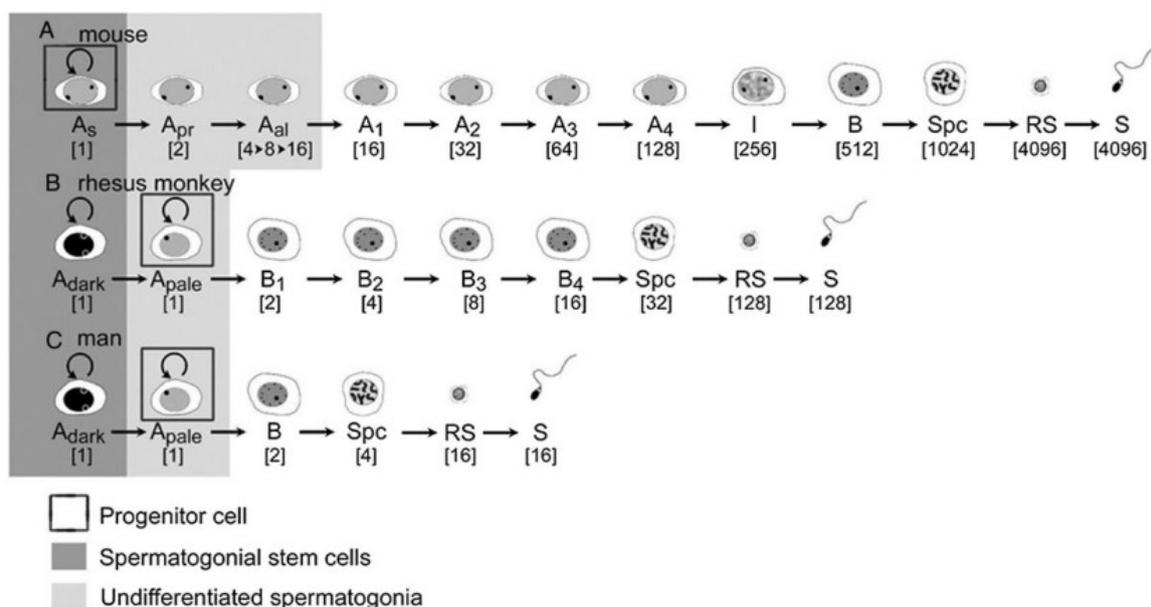


Figura 3. Representación de la diferenciación de células germinales masculinas en ratón (A), mono rhesus (B) y humano (C). A partir de las SSC, se generan espermatogonias indiferenciadas, que dan lugar a las células progenitoras y, en último término, a los espermatozoides (Ramm *et al.*, 2014).

A partir de estudios morfológicos que se han llevado a cabo en modelos de roedores, se ha propuesto que las espermatogonias en mamíferos no primates incluyen diferentes subtipos (Ibtisham y Honaramooz, 2020).

A diferencia de los mamíferos roedores, en los primates se diferencian espermatogonias *A-dark* y las *A-pale* en las espermatogonias de tipo A. El origen de esta denominación es la diferencia observada en cuanto a la tinción con hematoxilina; los núcleos de las espermatogonias *A-dark* se tiñen con una mayor densidad de hematoxilina que los de las *A-*

pale (Fayomi y Orwig, 2018). Ambos tipos se localizan en la membrana basal. Las *A-dark* comprenden una población de células con una baja actividad mitótica durante la espermatogénesis normal. En cambio, las *A-pale* se cree que proliferan continuamente (Ramm *et al.*, 2014; Ibtisham y Honaramooz, 2020).

En ratón, la espermatogénesis tiene lugar de la siguiente manera. Durante la fase proliferativa o mitótica las SSC dan lugar por mitosis a otros tipos de espermatogonias indiferenciadas, las espermatogonias *A-paired*, que a su vez se transforman en espermatogonias *A-aligned*, conectadas por puentes citoplasmáticos intercelulares debido a que la citocinesis no se completa (Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021). Se cree que estas conexiones son importantes para la coordinación en la diferenciación (Ibtisham y Honaramooz, 2020). Las SSC, las espermatogonias *A-paired* y las espermatogonias *A-aligned* expresan genes asociados a la proliferación y la autorrenovación (como, por ejemplo: *Grfa1*, *Ret*, *Nanos*, *Plzf*, *Id4*, *Pou5f1*, *Foxo1*, *Mir-17-92*, *Lin28a*, *Pax7*, *Neurog3*, *Sox3*, *Taf4b*, *Plap*, *Ap2y* y *Sall4*) (Chen y Liu, 2015; Cannarella *et al.*, 2019).

A continuación, por mitosis sucesivas, las espermatogonias *A-aligned* dan lugar a las espermatogonias diferenciadas (espermatogonias A₁, A₂, A₃, A₄, I y B), que a diferencia de las indiferenciadas, tienen una regulación negativa de los genes de autorrenovación y una regulación positiva de los relacionados con la diferenciación (*Sohlh1*, *Sohlh2*, *Dnmt1*, etc) (Cannarella *et al.*, 2019). Las espermatogonias B se dividen en dos espermatocitos primarios diploides que entran en la fase meiótica (Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021).

En la fase meiótica los espermatocitos primarios generan los espermatocitos secundarios tras la meiosis I, y las espermátidas redondas, células haploides, después de la meiosis II (Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021). La reducción de la ploidía es un paso crucial en la espermatogénesis puesto que, una vez que sucede la fecundación con la fusión del espermatozoide y el oocito, se produce la restauración del número de cromosomas de la especie (Bolcun-Filas y Handel, 2018).

Finalmente, durante la espermiogénesis las espermátidas redondas sufren una serie de cambios, tanto morfológicos como funcionales hasta transformarse en espermatozoides maduros (Rodríguez-Casuriaga y Geisinger, 2021). Estos cambios incluyen la condensación del ADN con protaminas, la formación del acrosoma y la pieza intermedia, la organización del flagelo y la reducción del citoplasma (Cannarella *et al.*, 2020).

Con relación al acrosoma, se trata de una vesícula secretora localizada en la parte anterior de los espermatozoides, que contiene enzimas proteolíticas, como la hialuronidasa, y que se genera a partir del aparato de Golgi en la última fase del proceso espermatogénico. Participa en

la interacción inicial entre el espermatozoide y el oocito en la fecundación, cuando tiene lugar la reacción acrosomal. La reacción acrosomal consiste en la liberación de las enzimas líticas por la fusión de la membrana del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide inducida por el *cumulus oophorus* o la zona pelúcida del oocito en función de la especie, para lograr la fusión espermatozoide-oocito (Fléchon, 2016).

1.3.2. El proceso espermatogénico en peces

En cuanto a la nomenclatura de los tipos celulares que conforman las células germinales de los peces, es similar a la empleada en los vertebrados superiores dado que los procesos de desarrollo que tienen lugar son equivalentes (Schulz *et al.*, 2010).

De la misma forma que en los mamíferos, la espermatogénesis se basa en la proliferación y diferenciación de las SSC y consta de tres fases, la fase mitótica con la generación de espermatogonias, la fase meiótica en la que se forman espermátocitos primarios y secundarios, y la fase de espermiogénesis, en la que las espermátidas haploides se diferencian en espermatozoides (Xie *et al.*, 2020).

Las espermatogonias A indiferenciadas generan espermatogonias diferenciadas, con un potencial de autorrenovación menor, y estas, a su vez, dan lugar a las espermatogonias tipo B. En algunas especies que tienen varias generaciones de espermatogonias, como por ejemplo el pez cebra que presenta 9, se hace una distinción entre espermatogonias B-*early* y B-*late*. Al igual que en mamíferos, las de tipo B se dividen más rápido que las de tipo A (Schulz *et al.*, 2010).

Las espermatogonias tipo B se diferencian en espermátocitos primarios, que entran en la fase meiótica y pasan por las etapas de preleptoteno, leptoteno/zigoteno, paquiteno y diploteno hasta transformarse en espermátocitos secundarios en la primera división meiótica y en espermátidas, tras la segunda (Schulz *et al.*, 2010).

Las espermátidas se diferencian finalmente en espermatozoides durante la espermiogénesis, que implica cambios morfológicos como la condensación nuclear, la eliminación de orgánulos y citoplasma, la formación de uno o dos flagelos y el reordenamiento de orgánulos. En función de la condensación nuclear, las espermátidas se pueden clasificar en E1, E2 y E3, espermátidas tempranas, intermedias y finales, respectivamente. (Schulz *et al.*, 2010).

A diferencia de los mamíferos, los espermatozoides de los peces teleósteos generalmente no tienen acrosoma: el corion, la capa externa que envuelve el oocito, presenta un micropilo, una perforación que permite el acceso de los espermatozoides a la membrana plasmática y, por tanto, la fecundación (Nóbrega *et al.*, 2010).

1.4. Regulación de la espermatogénesis

Las funciones testiculares están reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, en el cual la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, *Gonadotropin-releasing hormone*) controla de forma independiente y sincrónica la producción de hormonas esteroideas y la espermatogénesis mediante dos sistemas de retroalimentación separados: el eje hormona luteinizante (LH, *luteinizing hormone*)-testosterona y el eje FSH-inhibina, respectivamente (Figura 4) (Schlatt y Ehmcke, 2014).

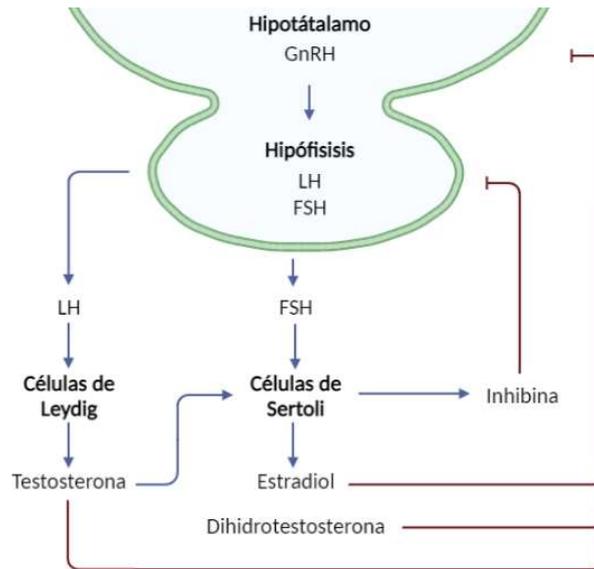


Figura 4. Regulación endocrina de la espermatogénesis a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La liberación de GnRH en el hipotálamo induce la secreción de LH y FSH en la hipófisis. Ambas gonadotropinas actúan en el testículo a nivel de las células de Leydig y las células de Sertoli, respectivamente, promoviendo la síntesis de hormonas esteroideas y la espermatogénesis (Elaborada con BioRender.com).

La liberación pulsátil de GnRH provoca la secreción de LH y FSH en la hipófisis. La LH estimula en las células de Leydig la liberación de andrógenos que inducen o mantienen el fenotipo masculino y ejercen un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel hipotalámico (Schlatt y Ehmcke, 2014). La testosterona es la principal hormona esteroidea en los testículos. Se ha comprobado que a pesar de que la espermatogénesis *in vivo* en roedores se puede inducir y mantener a concentraciones menores de las normales, su disminución provoca una reducción en el número de espermatozoides (Walker, 2021).

Por otra parte, la FSH actúa sobre las células de Sertoli regulando la producción de espermatozoides en el epitelio seminífero mediante el control de la expansión de las espermatogonias y su transición a espermatocitos. La inhibina B se considera la hormona de retroalimentación para la FSH en los primates (Schlatt y Ehmcke, 2014).

Al mismo tiempo, el ácido retinoico juega un papel importante en la regulación de la espermatogénesis. La transición de espermatogonias indiferenciadas a diferenciadas, con la

consecuente pérdida de la capacidad de autorrenovación, está impulsada por la síntesis de ácido retinoico a partir del retinol o vitamina A en las células de Sertoli y en las células germinales mediante una serie de reacciones metabólicas (Endo *et al.*, 2019; Gewiss *et al.*, 2020).

Actualmente, los mecanismos reguladores conocidos pueden servir como base para construir modelos de espermatogénesis fisiológicamente relevantes que incluyan el control endocrino y paracrino en contextos tanto fisiológicos como patológicos (Schlatt y Ehmcke, 2014).

2. ESPERMATOGÉNESIS *IN VITRO*: MODELOS DE ESTUDIO

El establecimiento de sistemas de cultivo *in vitro* eficientes que puedan replicar el proceso espermatogénico tiene numerosas aplicaciones tanto en el ámbito de la investigación básica, como en el ámbito clínico.

Con relación a la investigación básica, los modelos de espermatogénesis *in vitro* permitirían el estudio de los requisitos, mecanismos e interacciones entre las células germinales masculinas durante la proliferación y diferenciación de espermatozoides en un entorno de laboratorio controlado, lo cual ayudaría en la comprensión de las causas de la infertilidad o subfertilidad (Ibtisham y Honaramooz, 2020; Bourdon *et al.*, 2021).

Además, serían útiles para evaluar los efectos perjudiciales a largo plazo de moléculas presentes en el ambiente, incluidos los alimentos o condiciones ambientales relacionadas con el cambio climático, como la elevación de temperatura del suelo y agua, tanto en especies animales domésticas como silvestres en la reproducción (Bourdon *et al.*, 2021). Esto ofrecería la posibilidad de llevar a cabo experimentos que serían difíciles de realizar *in vivo*, como la edición del genoma de células germinales. Desde una perspectiva de ética animal, los modelos serían beneficiosos ya que reducirían el uso de animales (Ibtisham y Honaramooz, 2020).

La generación de espermatozoides *in vitro* se puede aplicar en reproducción asistida para humanos y animales, al proporcionar el entorno óptimo para el cultivo y la crioconservación. Es una herramienta prometedora en el campo de la cría de animales, por ejemplo para especies con especímenes de alto valor económico como los caballos y la conservación de la biodiversidad, ya que se podría emplear para el rescate de especies en peligro de extinción (Bourdon *et al.*, 2021).

Además, los sistemas de espermatogénesis *in vitro* serían de interés como modelo biomédico para humanos. Durante el tratamiento contra el cáncer las células germinales se destruyen, por lo que la única opción de preservación de la fertilidad en niños prepuberales que no pueden crioconservar espermatozoides, es conservar y cultivar tejido testicular que contenga SSC. Otras opciones serían la reinyección de las SSC en el testículo después del tratamiento o la

inducción de la maduración de las SSC *in vitro* y la posterior inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*) (Bourdon *et al.*, 2021).

En función de la metodología empleada en el establecimiento de sistemas de espermatogénesis *in vitro*, se diferencian tres enfoques: el cultivo de órganos o tejidos, el cultivo bidimensional de suspensiones celulares y el cultivo tridimensional.

2.1. Cultivo de órgano o tejidos

Los primeros grupos de investigación que intentaron establecer un sistema de espermatogénesis *in vitro* se centraron en el cultivo de fragmentos pequeños de tejido testicular o partes de túbulos seminíferos, con el fin de mantener la estructura tridimensional, conservar las interacciones entre las células somáticas y las células germinales y proporcionar el nicho adecuado para la diferenciación de las SSC. Sin embargo este enfoque presenta problemas en cuanto a las limitadas tasas de difusión en comparación con los cultivos celulares en monocapa, por lo que la viabilidad del tejido en el tiempo se ve comprometida (Ibtisham y Honaramooz, 2020). Los principales estudios de espermatogénesis *in vitro* mediante el cultivo de tejido testicular que se han realizado en roedores se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Principales estudios de espermatogénesis *in vitro* realizados mediante sistemas de cultivo de tejido en roedores.

Especie y edad (cita)	Método de cultivo	Condiciones de cultivo	Resultados	
Ratón recién nacido (Martinovitch, 1937)	Método del vidrio de reloj	Coágulo de plasma de ave y extracto de embrión de ave	Espermatocitos en paquitenio	
Rata adulta (Trowell, 1959)	Método de interfase gas-líquido	Medio mínimo esencial (MEM, <i>minimum essential medium</i>) de Eagle a 37 °C	Degeneración del tejido	
Rata de 4 días (Steinberger <i>et al.</i> , 1964a; 1964b)		MEM de Eagle	Espermatocitos	
Ratón de 2 meses con criptorquidia (Aizawa y Nishimune, 1979)		MEM de Eagle suplementado con suero de ternera a 32,5 °C	Espermatocitos en paquitenio	
Rata de 9 días (Boitani <i>et al.</i> , 1993)		MEM de Eagle con sales de Earle, FSH, LH, testosterona y vitaminas A, C y E a 32 °C	Espermatocitos en paquitenio. La FSH es esencial	
Ratón de 5 días (Suzuki y Sato, 2003)		MEM de Dulbecco con alanina, ácido aspártico, glicina, prolina, serina, glutamina y suero fetal bovino (FBS, <i>fetal bovine serum</i>)	Espermátidas redondas	
Ratón recién nacido (Sato <i>et al.</i> , 2011)		α -MEM con sustituto de suero o AlbuMAX	Espermátidas y espermatozoides	
Ratón adulto (Sato <i>et al.</i> , 2015)		α -MEM con sustituto de suero o AlbuMAX	Espermátidas y espermatozoides	
(Komeya <i>et al.</i> , 2016)		Dispositivo microfluídico	α -MEM con AlbuMAX	Espermátidas y espermatozoides
(Komeya <i>et al.</i> , 2017)		Dispositivo microfluídico sin bomba	α -MEM con AlbuMAX	Espermátidas

En 1920, Champy realizó la primera descripción sobre un cultivo de testículo y, por tanto, la primera sobre la espermatogénesis *in vitro*. Mantuvo durante una semana testículos de conejo en plasma de conejo y observó la formación de espermatoцитos. Sin embargo, la mayoría de las células germinales no sobrevivieron a este periodo (Komeya *et al.*, 2018).

Martinovitch consiguió el desarrollo de espermatoцитos en estadio de paquitenio empleando el método del vidrio de reloj. Aunque la estructura de muchos túbulos seminíferos se conservó durante 17 días, la mayoría de las células germinales degeneraron (Martinovitch, 1937).

Este método de cultivo se describió por primera vez en 1929. Consistía en colocar en una placa Petri con una capa de algodón humedecida en su interior, un vidrio de reloj, cuya superficie convexa estaba pintada de negro para facilitar su observación macroscópica. En el vidrio de reloj se añadía plasma de ave y extracto de embrión de ave a partes iguales y se dejaba coagular. Sobre los coágulos se colocaban los tejidos (Fell y Robison, 1929).

En 1959, Trowell diseñó un sistema de cultivo de órganos al que denominó interfase gas-líquido para experimentos a corto plazo. Constaba de una cámara que se dividía en dos compartimentos separados por una membrana, uno superior para el cultivo y uno inferior, el reservorio de gases. En el superior, se ponía una placa de cultivo con un soporte de agar y sobre este una rejilla de metal sobre la que se colocaba el fragmento de tejido. El medio de cultivo se vertía humedeciendo la agarosa y el tejido, permitiendo el transporte de nutrientes y al mismo tiempo, asegurando el intercambio gaseoso. Sin embargo, con el cultivo de testículo no obtuvo buenos resultados ya que degeneraba rápidamente (Trowell, 1959). Emil y Anna Steinberger emplearon este método y consiguieron mantener tejido testicular durante 4 semanas (Steinberger *et al.*, 1964a) y la diferenciación hasta espermatoцитos (Steinberger *et al.*, 1964b).

A diferencia de los estudios realizados por Emil y Anna Steinberger, Aizawa y Nishimune colocaron un filtro *Millipore* entre la rejilla y los fragmentos testiculares (Aizawa y Nishimune, 1979). Boitani y colaboradores también utilizaron este método con el fin de caracterizar los requisitos nutricionales de la espermatogénesis *in vitro* (Boitani *et al.*, 1993).

Una década después, Suzuki y Sato publicaron la obtención de espermátidas redondas en una proporción baja y el posterior desarrollo de embriones hasta el estadio de 8 células, tras su inyección en oocitos en metafase II (Suzuki y Sato, 2003). Aunque la composición del medio fue similar a la utilizada por Emil y Anna Steinberger, la diferencia en los resultados obtenidos puede deberse a una mejora de la calidad de los medios de cultivo y los suplementos y a una mayor facilidad de replicación *in vitro* de la espermatogénesis de ratón que la de rata (Komeya *et al.*, 2018).

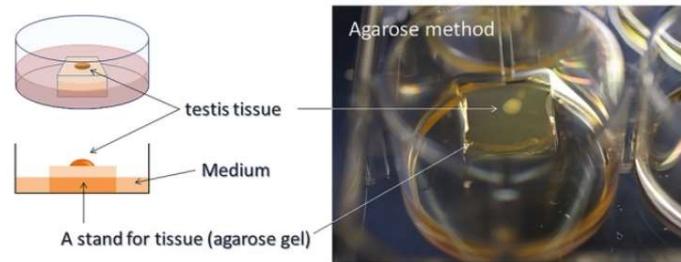


Figura 5. Método de la interfase gas-líquido para el cultivo de testículo y la espermatogénesis *in vitro*. El tejido se coloca sobre un soporte de agarosa y este se introduce en el medio de cultivo (Komeya *et al.*, 2018).

La producción de espermatozoides funcionales *in vitro* se consiguió en 2011, a partir del cultivo de fragmentos testiculares de ratón recién nacido, que solo contienen gonocitos. Los tejidos se colocaron sobre soportes de agarosa embebidos en medio de cultivo (**Figura 5**). Con las espermátidas y espermatozoides generados se llevó a cabo la microinyección mediante las técnicas de inyección de espermátidas redondas (ROSI, *round spermatid injection*) e ICSI. La eficiencia fue comparable a la obtenida a partir de gametos generados *in vivo*: se microinyectaron 23 oocitos mediante ROSI y 35 mediante ICSI y nacieron 7 y 5 crías respectivamente; todas ellas sanas y reproductivamente competentes (Sato *et al.*, 2011). Utilizando este sistema se obtuvieron también espermátidas y espermatozoides a partir de tejido testicular de ratones adultos, aunque con una eficiencia menor y no se evaluó la capacidad reproductiva mediante técnicas de reproducción asistida (Sato *et al.*, 2015).

El sistema de cultivo de tejido testicular sobre soportes de agarosa se modificó posteriormente a un sistema de microfluidos con el objetivo de mejorar la eficacia y la duración de la espermatogénesis *in vitro*. De esta forma, se fomentaba el intercambio de gases, nutrientes y productos de desecho al facilitar la difusión y crear condiciones que más representativas de los sistemas *in vivo* (Ibtisham y Honaramooz, 2020).

Komeya y colaboradores diseñaron un dispositivo microfluídico, en el que una membrana porosa y delgada de policarbonato separaba los tejidos testiculares del flujo de medio, simulando la función de los capilares, al suministrar continuamente medio fresco (**Figura 6**). Además, el espesor de la cámara donde se colocaba el tejido permitía la difusión de las moléculas desde la membrana y el crecimiento y desarrollo de los tejidos. Con relación a las ventajas que supone su empleo, destaca la inducción de la espermatogénesis en la mayor parte del tejido como consecuencia de su distribución plana en la cámara, la compatibilidad para la evaluación con microscopio invertido y la posibilidad de mantener la espermatogénesis *in vitro* en el tiempo, hasta 180 días. Utilizando este dispositivo se obtuvieron espermátidas y espermatozoides, cuya capacidad de fecundación se evaluó realizando ROSI e ICSI,

respectivamente. Se microinyectaron 29 oocitos mediante ROSI y 36 mediante ICSI y nacieron 9 y 5 crías en cada caso que se desarrollaron de forma normal (Komeya *et al.*, 2016).

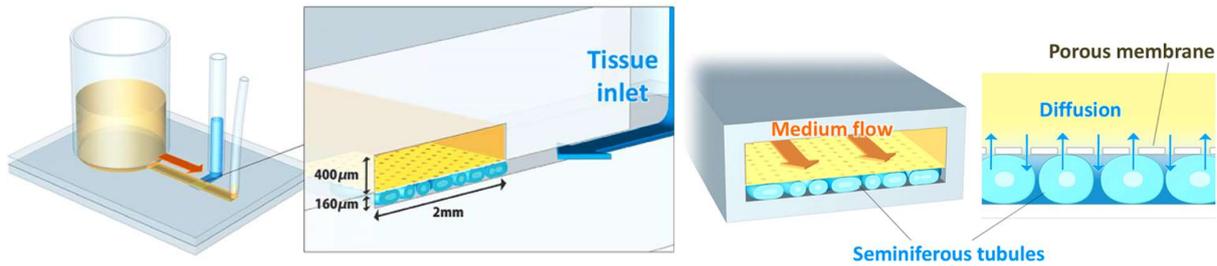


Figura 6. Dispositivo microfluídico para el cultivo de tejido testicular. El dispositivo se compone de una cámara en la que se introduce el tejido (izquierda). El medio de cultivo fluye sobre la membrana porosa y a través de esta se produce la difusión de las moléculas en ambos sentidos (derecha) (Komeya *et al.*, 2016).

Sin embargo, este sistema presenta limitaciones en cuanto a la bomba para el flujo del medio ya que el número de muestras está limitado por el número de bombas y la fabricación de dispositivos con microbombas integradas resultaría caro. Por lo que en base a este desarrollaron un dispositivo microfluídico sin bomba, que utilizaba presión hidrostática y no una fuente de alimentación externa (**Figura 7**). De forma análoga al anterior, constaba de dos placas de polidimetilsiloxano separadas por una membrana porosa. La capa superior presentaba un canal para el flujo de medio y un circuito de resistencia para regular el caudal y la inferior, una cámara para los tejidos. Con este sistema se consiguió la espermatogénesis *in vitro* durante 3 meses en tejido testicular de ratón. Durante este periodo, se identificaron espermátidas pero no se evaluó su capacidad de fecundación mediante ROSI (Komeya *et al.*, 2017).

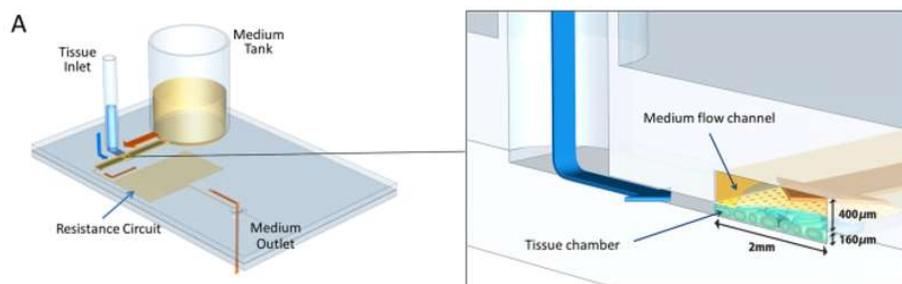


Figura 7. Dispositivo microfluídico sin bomba para el cultivo de tejido testicular. El dispositivo se compone de una cámara en la que se introduce el tejido y un circuito de resistencia que permite el flujo de medio sin necesidad de una bomba (izquierda). El medio de cultivo fluye sobre la membrana porosa y a través de esta se produce la difusión de las moléculas en ambos sentidos (derecha) (Komeya *et al.*, 2017).

2.2. Sistemas de cultivo celular en dos dimensiones

Los sistemas de cultivo bidimensionales (2D) que utilizan suspensiones de células testiculares obtenidas por tratamiento enzimático también se han utilizado tanto para la proliferación *in vitro* de SSC como para la generación de células germinales haploides masculinas. En comparación con los cultivos organotípicos de tejido testicular presentan dos

desventajas: no replican las interacciones celulares ni las condiciones estructurales que se dan en los túbulos seminíferos y debido a la ausencia de esta estructura es difícil distinguir los tipos celulares sin realizar un análisis mediante citometría de flujo (Ibtisham y Honaramooz, 2020).

La investigación en los modelos de espermatogénesis *in vitro* se dirigió hacia el cultivo celular a raíz de los resultados obtenidos en las décadas de 1960 y 1970, en los que solo se llegaba a la diferenciación hasta espermatocono en fase de paquiteno (Komeya *et al.*, 2018). En la **Tabla 2** se recogen los principales estudios.

Tabla 2. Principales estudios de espermatogénesis *in vitro* realizados mediante sistemas de cultivo celular 2D.

Especie y edad (cita)	Método de cultivo	Condiciones de cultivo	Resultados
Ratón de 6-15 semanas (Dietrich <i>et al.</i> , 1983)	Cultivo de células testiculares	Tratamiento con hidroxiaurea para eliminar las células germinales diferenciadas	Espermatoconos
Rata de 20-35 días (Tres y Kierszenbaum, 1983)	Cocultivo de células germinales y células de Sertoli	MEM de Eagle con factor de crecimiento epidérmico (EGF, <i>epidermal growth factor</i>) y FSH, alternando concentraciones bajas y altas	Espermatoconos en paquiteno
Rata adulta (Le Magueresse-Battistoni <i>et al.</i> , 1991)		MEM Dulbecco-F12 con insulina, transferrina, ácido retinoico, factor de crecimiento transformante (TGF- α , <i>transforming growth factor alpha</i>), FSH y testosterona	Espermátidas
Rata de 23-25 días (Hue <i>et al.</i> , 1998); Rata de 20-28 días (Staub <i>et al.</i> , 2000)		MEM Dulbecco-F12 con FBS, testosterona y FSH	Espermátidas redondas
Ratón de 13-18 días (Marh <i>et al.</i> , 2003)		Medio sin suero con insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1, <i>insulin-like growth factor 1</i>), hormona de crecimiento, EGF, retinol y testosterona	Espermátidas redondas
Rata de 7 días (Iwanami <i>et al.</i> , 2006)		MEM de Eagle modificado por Dulbecco con FBS, EGF, IGF-1, FSH, transferrina, retinol, testosterona y dihidrotestosterona	Espermátidas redondas
Ratón de 6 días (Wang <i>et al.</i> , 2014)	Cultivo de SSC	Medio con FBS (3 días), medio con ácido retinoico (2 días) y medio con FBS (6-8 días)	Células haploides

Las primeras investigaciones que evidenciaron la posibilidad de generación de células germinales masculinas haploides mediante cultivo 2D se publicaron en 1983. Dietrich y colaboradores consiguieron la diferenciación de células germinales en espermatoconos (Dietrich *et al.*, 1983). Sin embargo, adoptaron unas condiciones que dificultan su repetición (Komeya *et al.*, 2018). Tres y Kierszenbaum observaron la diferenciación hasta espermatoconos en paquiteno mediante el cocultivo de células germinales con células de Sertoli (Tres y Kierszenbaum, 1983).

Este método de cocultivo se empleó en estudios posteriores, que demostraron la importancia del mantenimiento de las interacciones entre las células de Sertoli y las células germinales en

los cultivos 2D (Ibtisham y Honaramooz, 2020). En 1991, se logró la obtención de espermátidas a partir de espermatoцитos en paquitenos en rata (Le Magueresse-Battistoni *et al.*, 1991), y en 1998, se hizo en un periodo de tiempo muy similar al de la espermatogénesis *in vivo* (Hue *et al.*, 1998). Dos años después se obtuvo una mayor diferenciación, se generaron espermátidas redondas a partir de espermatoцитos en leptoteno (Staub *et al.*, 2000).

La primera vez que se consiguió la producción de descendencia a partir de espermátidas redondas obtenidas *in vitro* mediante un cultivo 2D se publicó en 2003. Algunas espermátidas tenían entre 1 y 4 flagelos, que se movían con un movimiento ondulatorio y asincrónico. Las espermátidas recogidas del cocultivo se microinyectaron en oocitos y a pesar de que su contribución en la formación del cigoto fue menor en comparación con las espermátidas generadas *in vivo*, nacieron a crías fértiles (Marh *et al.*, 2003).

En 2006, se intentó llevar a cabo la espermatogénesis *in vitro* de espermatogonias de tipo A de rata mediante el cocultivo con células de Sertoli. Se logró la diferenciación de células similares a espermátidas redondas, algunas con un flagelo móvil. Sin embargo los embriones generados después de realizar la microinyección no llegaron a término (Iwanami *et al.*, 2006).

Por último, otro de los métodos para inducir la espermatogénesis *in vitro* que se llevó a cabo años más tarde es el cultivo de SSC. Wang y colaboradores establecieron un protocolo para inducir la diferenciación de SSC en células haploides *in vitro*. Se determinó mediante el análisis de expresión de genes característicos de células germinales haploides masculinas, por lo que se deberían hacer más estudios para determinar la fase de diferenciación (Wang *et al.*, 2014).

A pesar de que se han realizado múltiples estudios para lograr la espermatogénesis *in vitro* en cultivos celulares 2D y se ha visto que unas condiciones óptimas, como el mantenimiento del contacto con las células de Sertoli, pueden dar lugar a la diferenciación de las células germinales todavía hay un desconocimiento sobre los procesos de desarrollo involucrados (Ibtisham y Honaramooz, 2020).

2.3. Sistemas de cultivo celular en tres dimensiones

Ante los resultados insatisfactorios obtenidos en el desarrollo de modelos de cultivos 2D capaces de llevar a cabo el proceso espermatogénico *in vitro*, las investigaciones a partir de los 2000 se dirigieron hacia la construcción de estructuras tridimensionales artificiales (Komeya *et al.*, 2018). En ellas se conserva la organización testicular espacial presente *in vivo*, así como la señalización paracrina, importante para la proliferación y diferenciación de las células germinales y el mantenimiento de la diferenciación de las células somáticas (Tharmalingam *et al.*, 2018). En la **Tabla 3** se muestran los estudios principales que han seguido este enfoque.

Tabla 3. Principales estudios de espermatogénesis *in vitro* realizados mediante sistemas de cultivo celular 3D.

Especie y edad (cita)	Método de cultivo	Condiciones	Resultados
Rata de 18 días (Lee et al., 2006)	Cultivo en geles de colágeno y Matrigel	MEM Dulbecco-F12 con Matrigel	Espermátidas
Ratón de 10 días (Stukenborg et al., 2008)	Sistema de cultivo en agar blando (SACS, <i>soft-agar culture system</i>)	MEM Dulbecco-F12	Células haploides
Ratón de 7-9 días (Stukenborg et al., 2009)	Sistema de cultivo de metilcelulosa (MCS, <i>methylocellulose culture system</i>)	MEM Dulbecco-F12 con gonadotropina coriónica humana y FSH	Espermatozoides
Ratón recién nacido (Yokonishi et al., 2013)	Método de interfase gas-líquido	α -MEM con sustituto de suero y GDNF	Espermátidas redondas
Rata de 5-60 días (Alves-Lopes et al., 2017)	Sistema de gradiente de tres capas (3-LGS, <i>three-layer gradient system</i>)	α -MEM con sustituto de suero y ácido retinoico	No progresión

En 2006, Lee y colaboradores cultivaron células testiculares de rata en geles de colágeno y Matrigel. Consiguieron un aumento de viabilidad celular respecto al cultivo en monocapa, la formación de estructuras similares a cistes por uniones entre las células de Sertoli y las células germinales y la diferenciación hasta espermátidas (Lee et al., 2006).

Un par de años después, se publicó el empleo del SACS, que constaba de 2 fases con diferentes concentraciones de agar, una fase de gel (0,35 %) y una fase sólida (0,5 %). Esta disposición permite la incorporación de factores y/o células en la fase sólida, sin contaminar la fase de gel. Se observó la expresión de marcadores específicos de la meiosis cuando en la fase de gel se cultivaron todas las células testiculares (Stukenborg et al., 2008).

En 2009, el SACS se modificó, sustituyendo el agar por metilcelulosa, dando lugar al MCS. Se evaluó la capacidad de mantener la espermatogénesis *in vitro* en ambos sistemas, en el SACS y el MCS, y se observó que se generaron espermatozoides morfológicamente normales independientemente de la matriz empleada (Stukenborg et al., 2009).

Años más tarde se demostró la capacidad de las células testiculares de generar una estructura similar a la de los tubos seminíferos *in vitro*, sin necesidad de sistema circulatorio. Estas estructuras se cultivaron mediante el método de interfase gas-líquido sobre soportes de agarosa y se logró la diferenciación desde SSC hasta espermátidas redondas, aunque con una eficiencia menor a la obtenida en los cultivos de tejido (Yokonishi et al., 2013).

La generación de organoides testiculares se llevó a cabo posteriormente. Alves-Lopes y colaboradores introdujeron el método 3-LGS y consiguieron la organización de estructuras tubulares esféricas a partir del cultivo en gotas de suspensiones de células testiculares en Matrigel embebidas en un volumen mayor de Matrigel. Se formó una barrera hematotesticular funcional, sin embargo no se observó una progresión en la espermatogénesis (Alves-Lopes et al., 2017).

3. CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD

La diversidad genética del ganado y los animales salvajes ha disminuido en las últimas décadas debido a las demandas cambiantes del mercado y la intensificación de la agricultura y ganadería (Devi y Goel, 2016). Además, el estado en peligro de extinción de muchas especies hoy en día podría resultar en una pérdida importante de la biodiversidad en los próximos años, acelerada principalmente por la actividad humana (O'Brien *et al.*, 2019).

Para evitar la extinción los esfuerzos se han centrado en la preservación de hábitats naturales y la creación de bancos de germoplasma de espermatozoides, oocitos y embriones y, recientemente, también de tejidos somáticos y gonadales, como el tejido testicular. La criopreservación en bancos de germoplasma de tejido testicular, supone una alternativa para especies silvestres cuyos procedimientos de recolección de semen no son eficientes, individuos que no han iniciado la espermatogénesis y situaciones de elevada mortalidad neonatal y juvenil, debido a enfermedades, malas prácticas de manejo o endogamia (Devi y Goel, 2016; Silva *et al.*, 2020).

La estrategia seguida consistiría en la recolección de tejido testicular de individuos vivos sexualmente inmaduros o adultos o *post mortem*; su conservación mediante sistemas de criopreservación (opcional) y el cultivo posterior (**Figura 8**) (Silva *et al.*, 2020).

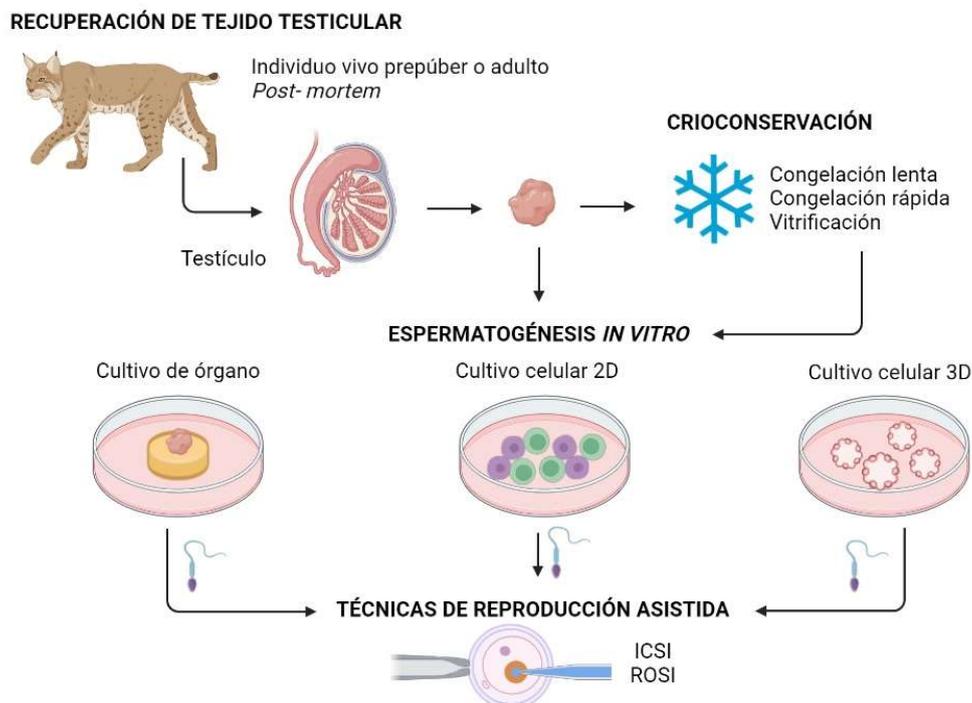


Figura 8. Estrategia general para la conservación de la biodiversidad mediante la espermatogénesis *in vitro*. Consistiría en la recuperación de tejido testicular seguida de la criopreservación, en caso de ser necesario. El establecimiento de un cultivo de tejido, celular 2D o 3D permitiría llevar a cabo en las condiciones óptimas la generación de células germinales haploides. Mediante técnicas de reproducción asistida, como ICSI en el caso de espermatozoides y ROSI para espermátidas redondas, se generarían los nuevos individuos (Elaborada con BioRender.com).

Con relación a la recuperación del tejido testicular, existen diferentes aspectos que pueden afectar al éxito posterior del procedimiento, como el tamaño de los fragmentos, las condiciones de almacenamiento y transporte antes de la criopreservación y, en el caso de la recolección *post mortem*, la temperatura del entorno y el tiempo transcurrido entre la muerte del individuo y la extracción, ya que parecen influir en la morfología testicular (Silva *et al.*, 2020).

Una vez se ha realizado la recolección del tejido testicular, en caso de ser necesario, se puede llevar a cabo la criopreservación, es decir, el almacenamiento de las muestras biológicas congeladas durante un período prolongado de tiempo, manteniendo su viabilidad; utilizando métodos de congelación lenta, rápida o de vitrificación (Devi y Goel, 2016). La congelación lenta se caracteriza por una disminución gradual de la temperatura utilizando una velocidad de enfriamiento de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de $-259\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, con concentraciones bajas de crioprotector para reducir la toxicidad. En cambio, en la congelación rápida se usan tres velocidades de enfriamiento de $-10,8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, y $-252\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por otro lado, la vitrificación resulta más eficaz y rentable que la congelación lenta. Consiste en una reducción de la temperatura a una velocidad entre -20000 y $-40000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y empleando altas concentraciones de crioprotector que pueden causar toxicidad (Silva *et al.*, 2020).

El éxito de la crioconservación depende de la elección del crioprotector y su concentración, y de los procedimientos tanto de congelación como de descongelación (Yokonishi y Ogawa, 2016). A pesar de que no se han observado diferencias entre tejidos testiculares prepuberales y adultos, las características estructurales propias que pueden diferir de unas especies a otras influyen en el método de crioconservación y en la digestión enzimática previa, en caso de que se lleve a cabo (Comizzoli y Holt, 2014).

Tabla 4. Estudios de espermatogénesis *in vitro* realizados en especies domésticas.

Especie (cita)	Criopreservación	Cultivo <i>in vitro</i>
Ratón (Yokonishi <i>et al.</i> , 2014)	Congelación lenta Vitrificación	Cultivo de órgano: método interfase gas-líquido
Toro (Zheng <i>et al.</i> , 2015)	-	Cultivo 2D: cocultivo células germinales y células de Sertoli
Caballo (Costa <i>et al.</i> , 2017)	Congelación lenta Congelación rápida Vitrificación	Cultivo 2D
Gato doméstico (Silva <i>et al.</i> , 2018)	-	Cultivo de órgano: método interfase gas-líquido
Cerdo doméstico (Yu <i>et al.</i> , 2019)	-	
Cordero (Singh <i>et al.</i> , 2019)	Congelación lenta	
Cabra macho (Patra <i>et al.</i> , 2021)	Vitrificación	Cultivo de órgano: método interfase gas-líquido y método de la gota colgante

Respecto al cultivo *in vitro*, el objetivo es la obtención de espermatozoides viables que se puedan destinar a técnicas de reproducción asistida. Se ha empleado en la conservación de tejido testicular en investigación en varias especies domésticas (**Tabla 4**), por lo que la aplicación a especies salvajes requiere la adaptación de los protocolos actuales, la optimización del medio de cultivo y la elección del sistema de cultivo (Silva *et al.*, 2020).

Dado que la mayoría de los estudios sobre espermatogénesis *in vitro* se han realizado en roedores, es en estas especies, y especialmente en el ratón, en las que se han conseguido los mayores éxitos. En 2014, Yokonishi y colaboradores lograron la obtención de descendencia mediante ICSI con espermatozoides generados *in vitro* a partir del cultivo de tejido testicular de ratón previamente criopreservado. Compararon la congelación lenta y la vitrificación empleando distintos crioprotectores y evaluaron su efecto en la diferenciación de las células germinales. A pesar de que determinaron que los resultados de espermatogénesis alcanzados después de la vitrificación con el crioprotector *Stem Cell Keep* fueron comparables a los obtenidos con los tejidos frescos, concluyeron que la mejora de las condiciones de cultivo es un factor más crítico que el método de criopreservación para aumentar la tasa de espermatogénesis. También indicaron que uno de los inconvenientes que presenta su método es que solo funciona en ratón, por lo que sería necesaria la optimización para su aplicación a otras especies (Yokonishi *et al.*, 2014).

En cuanto a la espermatogénesis *in vitro* en especies domésticas, en la última década se han publicado numerosos trabajos siguiendo diferentes enfoques. Sin embargo, los resultados alcanzados difieren bastante. En 2015 se publicó un estudio en el que se consiguió la diferenciación de espermatozoides a partir de un cocultivo de células germinales y células de Sertoli disociadas de tejido testicular de toro recién nacido. Establecieron en primer lugar un cultivo en monocapa de células de Sertoli, que interaccionaron entre sí formando uniones, y, a continuación, incorporaron las células germinales. Durante el cultivo, se llegaron a formar estructuras similares a túbulos seminíferos (Zheng *et al.*, 2015). Puesto que no se evaluó la posibilidad de criopreservación ni la capacidad de las células germinales haploides para dar lugar a descendencia mediante ROSI o ICSI, se debería realizar en el futuro para determinar su potencial aplicación en la reproducción de individuos de valor económico elevado.

Más adelante, Costa y colaboradores desarrollaron un protocolo eficiente para el enriquecimiento mediante centrifugación en un gradiente de densidad Percoll discontinuo de SSC de caballo. Además, evaluaron los tres métodos de criopreservación y distintos crioprotectores, y concluyeron que la congelación lenta empleando dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotector resultó la mejor opción ya que permitía una alta viabilidad de las SSC

manteniendo su comportamiento *in vitro* y la expresión de genes característicos. Sin embargo, solo se evaluó el cultivo a corto plazo, durante una semana, y no el proceso espermatogénico (Costa *et al.*, 2017). En este aspecto, no se ha encontrado ningún estudio que lo evalúe.

Las diferencias entre especies en cuanto al comportamiento celular en cultivo y al desarrollo de la espermatogénesis *in vitro* que destacan todos los autores, se hacen evidentes en estudios como el publicado por Silva y colaboradores en 2018, en el que intentaron establecer un sistema de espermatogénesis *in vitro* a partir de tejido testicular de gato, siguiendo un protocolo descrito previamente para ratón. A diferencia de lo ocurrido con el modelo de ratón, en el cultivo de tejido testicular de gato se observó un deterioro de la estructura con el tiempo y una interrupción en la diferenciación: las células germinales no se desarrollaban más allá de la etapa espermatogonial. Esta mayor complejidad en la iniciación y progresión de la espermatogénesis respecto al ratón requiere un mayor estudio del proceso para el establecimiento y la optimización de sistemas que permitan la espermatogénesis *in vitro*. Estos sistemas servirían como base en la conservación de especies de felinos silvestres, muchas de ellas amenazadas o en peligro de extinción (Silva *et al.*, 2018).

Con relación al cerdo, un año después se consiguió la diferenciación de espermátidas redondas a partir del cultivo de segmentos de túbulos seminíferos, y el posterior desarrollo hasta blastocisto de embriones generados mediante ROSI. Además observaron que la suplementación del medio de cultivo con ácido retinoico incrementaba la tasa de diferenciación de células haploides (Yu *et al.*, 2019).

También en 2019, se describió el establecimiento de un cultivo de fragmentos de tejido testicular congelado y descongelado previamente de cordero con el fin de evaluar la influencia de la esfingosina-1-fosfato. A pesar de que no observaron la diferenciación de espermatozoides, determinaron que este lípido durante la primera semana de cultivo promovía la proliferación de las células germinales y podría ejercer un efecto antiapoptótico (Singh *et al.*, 2019).

Recientemente, Patra y colaboradores compararon el método de interfase gas-líquido y el método de la gota colgante en el cultivo de tejido testicular de cabra vitrificado y calentado y la progresión de la espermatogénesis *in vitro*. Evaluaron el efecto del tamaño de los fragmentos después del calentamiento y determinaron que los de menor tamaño presentaban una mayor viabilidad, lo cual se relacionó con una mayor actividad de especies reactivas de oxígeno, fracturas en el tejido y daños tanto en la arquitectura como en las células. Respecto al mantenimiento de la estructura durante el cultivo observaron que el método de la interfase gas-líquido ofrecía mejores resultados que el de la gota colgante, en el que los tejidos perdían su estructura al cabo de dos semanas. Además, en los tejidos cultivados mediante el método de la

interfase gas-líquido se llegaron a observar células similares a espermatozoides. Sin embargo no se llevó a cabo una evaluación de estas, por lo que se debería hacer en estudios futuros (Patra *et al.*, 2021).

En cuanto a la aplicación de la conservación de tejido testicular y el establecimiento de sistemas de espermatogénesis *in vitro* en animales silvestres, las investigaciones realizadas son escasas y aún más en especies amenazadas o en peligro de extinción.

El hurón de patas negras (*Mustela nigripes*) es una especie en peligro de extinción. En 2020, Lima y colaboradores publicaron el primer estudio sobre la crioconservación de su tejido testicular. Obtuvieron el tejido testicular de individuos fallecidos y llevaron a cabo la vitrificación. Después de la descongelación, establecieron un cultivo mediante el método de interfase gas-líquido, colocando los fragmentos de tejido sobre un soporte de agar, embebido parcialmente en el medio de cultivo. Puesto que el periodo de incubación tan solo abarcó 24 h, no se llegó a evaluar el proceso espermatogénico, pero se concluyó que los tejidos mantuvieron la estructura y no perdieron la capacidad de reanudar la diferenciación de las células germinales (Lima *et al.*, 2020).

4. PRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD

Como resultado de las mejoras en los tratamientos contra el cáncer, las tasas de mortalidad en niños y adolescentes están disminuyendo (Picton *et al.*, 2015). Por esta razón, existe un número creciente de individuos que sufren los efectos adversos de los tratamientos a los que se sometieron. Tanto la quimioterapia como la radioterapia afectan preferentemente a las células en división, incluidas las espermatogonias y los espermatoцитos, y pueden causar daños que pueden conducir a la infertilidad, ya sea de forma transitoria o de por vida. Estos efectos son dependientes de la dosis o de la intensidad del tratamiento y pueden provocar no solo la reducción en el número de espermatozoides, sino también alteraciones cromosómicas, como aneuploidías o translocaciones durante la meiosis (Yokonishi y Ogawa, 2016).

La criopreservación de espermatozoides se utiliza habitualmente para preservar la fertilidad en hombres. Sin embargo, no es una opción viable en pacientes preadolescentes que no han comenzado a producir espermatozoides (Picton *et al.*, 2015). La crioconservación de un fragmento de tejido testicular inmaduro que contiene SSC mediante la realización previa de una biopsia testicular es la única opción potencial de preservación de la fertilidad (Kanbar *et al.*, 2022). Se trata de una estrategia que se lleva a cabo con fines experimentales y su aplicación en el futuro permitiría la preservación de las diferentes células testiculares, manteniendo las SSC en su nicho natural y proporcionando los contactos célula a célula entre las células

somáticas y las germinales. (Devi y Goel, 2016). En la **Figura 9** se muestra el procedimiento general que se seguiría antes de iniciar el tratamiento oncológico. Se llevaría a cabo una biopsia testicular y, a continuación, la criopreservación del tejido extraído. Una vez que el paciente llegue a la edad adulta, si desea tener descendencia biológica, se establecería un sistema *in vitro* para inducir la espermatogénesis y obtener células germinales haploides, ya sean espermátidas o espermatozoides, para realizar la fecundación mediante técnicas de reproducción asistida, ROSI o ICSI respectivamente.

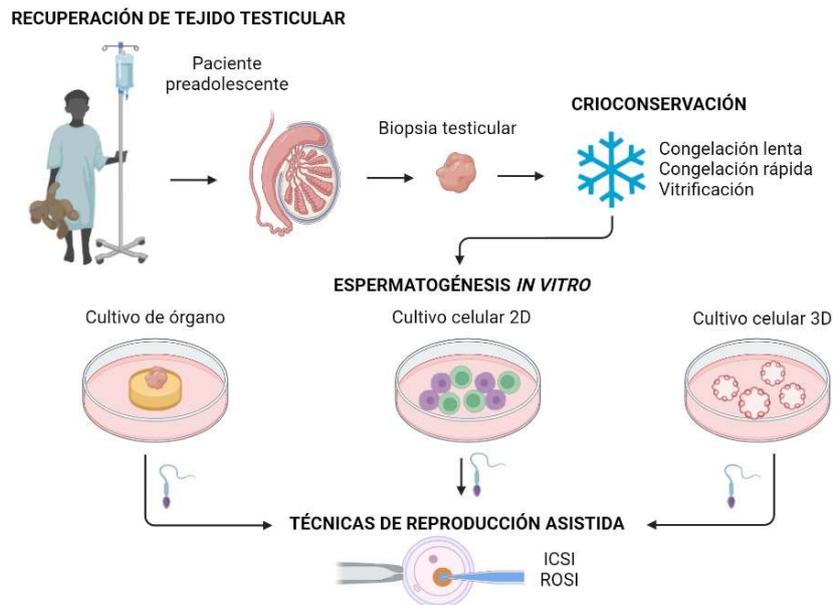


Figura 9. Estrategia general para la preservación de la fertilidad en pacientes preadolescentes mediante espermatogénesis *in vitro*. El procedimiento consistiría en la realización de una biopsia testicular y en la criopreservación del fragmento. Posteriormente se establecería un sistema para producir células haploides *in vitro* y se llevaría a cabo la fecundación mediante técnicas de reproducción asistida (Elaborada con BioRender.com).

La biopsia de tejido testicular es un procedimiento que se realiza en condiciones de anestesia general y aunque no se lleva a cabo de forma rutinaria en niños, se considera un procedimiento sencillo. La extracción del 5 % del volumen testicular es suficiente. Además se recomienda destinar una parte a estudios histopatológicos (Faure *et al.*, 2016).

En cuanto a la criopreservación, no existe un protocolo óptimo ya que el estudio de la metodología en humanos es difícil debido al acceso limitado al tejido testicular (Devi y Goel, 2016). La espermatogénesis *in vitro* se puede llevar a cabo mediante el cultivo organotípico de fragmentos de tejido testicular o el cultivo de suspensiones celulares 2D o 3D. La ventaja que presenta el desarrollo de gametos *in vitro* frente al trasplante autólogo posterior de tejido es que evita la posibilidad de reintroducción de células tumorales en los pacientes. Hasta el momento el nacimiento de crías sanas con o sin fertilidad comprobada solo se ha descrito en ratones (Wyns *et al.*, 2021). En la **Tabla 5** se muestran los estudios sobre espermatogénesis *in vitro* a partir de tejido testicular humano publicados en los últimos años.

Tabla 5. Estudios de espermatogénesis *in vitro* realizados en humanos.

Edad (cita)	Criopreservación	Cultivo <i>in vitro</i>
2-12 años (De Michele <i>et al.</i> , 2017)	Congelación lenta	Cultivo de órgano: método interfase gas-líquido
6-13 años (Abofoul-Azab <i>et al.</i> , 2018)		Cultivo 3D: MCS
2-12 años (De Michele <i>et al.</i> , 2018a y 2018b)		Cultivo de órgano: método interfase gas-líquido
7-14 años (Medrano <i>et al.</i> , 2018)		
6-14 años (Portela <i>et al.</i> , 2019)		

En 2017, De Michele y colaboradores consiguieron mantener en cultivo fragmentos de tejido testicular de pacientes preadolescentes durante 139 días, preservando la integridad de los túbulos seminíferos. El aumento de la concentración de testosterona en el sobrenadante del cultivo demostró la funcionalidad de las células de Leydig, y la presencia de GDNF, la funcionalidad de las células de Sertoli. También destacaron que las principales limitaciones del estudio son la escasez de tejido testicular humano y la cantidad, relativamente pequeña, de tejido disponible por cada paciente (De Michele *et al.*, 2017).

De forma complementaria evaluaron la formación de la barrera hematotesticular en el cultivo *in vitro* mediante el análisis de los patrones de expresión de las proteínas claudina 11 y conexina 43, componentes principales de las uniones estrechas y las uniones *gap*, respectivamente, y compararon los resultados con los patrones de expresión de las proteínas *in vivo*. Demostraron el establecimiento de la barrera hematotesticular al cabo de 16 días de cultivo, lo cual es más rápido que la formación de esta *in vivo*. Los investigadores indicaron que se requiere una mayor investigación para comprender mejor su importancia en la finalización de la espermatogénesis (De Michele *et al.*, 2018a).

Ese mismo año consiguieron la diferenciación de las células germinales hasta la fase de espermátidas redondas a partir de tejido testicular de pacientes preadolescentes criopreservado y empleando el mismo sistema de cultivo. El proceso tuvo lugar de forma más rápida que *in vivo*, posiblemente por las condiciones de cultivo; sin embargo, se observó una pérdida de espermatogonias durante el periodo de cultivo. El grupo de investigación concluyó que todavía es necesario un mayor estudio para lograr la diferenciación de espermatozoides, evaluar las características genéticas y epigenéticas de estos y adaptar las condiciones de cultivo; lo cual está limitado por la escasez de tejido testicular humano (De Michele *et al.*, 2018b).

Medrano y colaboradores determinaron que el cultivo a 34 °C ofrecía mejores resultados que a 37 °C, tal y como sucede *in vivo* en humanos, pese a que las células germinales no superaron la meiosis. Las diferencias en los resultados respecto a los estudios anteriores pueden deberse

a la diferente etapa de maduración inicial del tejido y las diferencias en las condiciones de cultivo y en la composición de los medios (Medrano *et al.*, 2018).

Al igual que en estos estudios, Portela y colaboradores experimentaron la pérdida de espermatogonias durante el periodo de cultivo debido tanto a una proliferación reducida como a una apoptosis elevada y no consiguieron la inducción de la espermatogénesis. Además compararon el comportamiento de tejido fresco y tejido crioconservado y determinaron que no se dieron diferencias significativas (Portela *et al.*, 2019).

A pesar de que supondría un riesgo para su aplicación clínica, en 2018 se evaluó la capacidad de llevar a cabo la espermatogénesis *in vitro* de tejido de pacientes que habían recibido quimioterapia con agentes alquilantes. Se consiguió la generación de células similares a espermatozoides a partir del cultivo de células germinales disociadas de tejido; sin embargo, no se analizó su ploidía (Abofoul-Azab *et al.*, 2018).

Además de las dificultades técnicas que supone actualmente el desarrollo de los modelos de espermatogénesis *in vitro* en la preservación de la fertilidad de pacientes preadolescentes y que deberían superarse para su aplicación clínica, también aparecen las cuestiones éticas y legales, dado que afecta a individuos menores de edad (Wyns *et al.*, 2021).

5. CONCLUSIONES

El establecimiento de sistemas de cultivo *in vitro* con capacidad de llevar a cabo el proceso de espermatogénesis *in vitro* presenta numerosas aplicaciones potenciales, a pesar de que todavía requiere de un mayor estudio e investigación, tanto para determinar las condiciones óptimas en las especies modelo como para su aplicación a especies diferentes.

No obstante, no solo se deberían optimizar las condiciones para conseguir la espermatogénesis *in vitro* completa, sino que se debería llevar a cabo una evaluación de las células obtenidas. Además de evaluar su capacidad de fecundación mediante técnicas de reproducción asistida y el estado de la descendencia resultante, como ya describen algunas publicaciones, habría que evaluar cuidadosamente las modificaciones epigenéticas que se pueden producir en el ambiente *ex vivo*.

Las aplicaciones del desarrollo de estos sistemas son muy prometedoras y representan también ventajas desde el punto de vista ético, ya que permiten reducir el número de animales utilizados en experimentación. Sin embargo, aún es necesario un mayor conocimiento de los procesos básicos antes de que los sistemas *in vitro* puedan ser utilizados de forma estandarizada.

6. REFERENCIAS

- Abofoul-Azab, M., Abumadighem, A., Lunenfeld, E., Kapelushnik, J., Shi, Q., Pinkas, H. y Huleihel, M. (2018) "Development of postmeiotic cells *in vitro* from spermatogonial cells of prepubertal cancer patients", *Stem Cells and Development*, 27(15), pp. 1007–1020.
- Aizawa, S. y Nishimune, Y. (1979) "In vitro differentiation of type A spermatogonia in mouse cryptorchid testis.", *Journal of reproduction and fertility*, 56(1), pp. 99–104.
- Alves-Lopes, J. P., Söder, O. y Stukenborg, J. B. (2017) "Testicular organoid generation by a novel *in vitro* three-layer gradient system", *Biomaterials*, 130, pp. 76–89.
- BioRender.com (2022) *BioRender*. Disponible en <https://biorender.com> (Accedido: 22 de junio de 2022).
- Boitani, C., Politi, M. G. y Menna, T. (1993) "Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis", *Biology of Reproduction*, 48(4), pp. 761–767.
- Bolcun-Filas, E. y Handel, M. A. (2018) "Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction", *Biology of Reproduction*, 99(1), pp. 112–126.
- Bourdon, G., Cadoret, V., Charpigny, G., Couturier-Tarrade, A., Dalbies-Tran, R., Flores, M. J., Froment, P., Raliou, M., Reynaud, K., Saint-Dizier, M. y Jouneau, A. (2021) "Progress and challenges in developing organoids in farm animal species for the study of reproduction and their applications to reproductive biotechnologies", *Veterinary Research*, 52(1): 42.
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Duca, Y., La Vignera, S. y Calogero, A. E. (2019) "New insights into the genetics of spermatogenic failure: a review of the literature", *Human Genetics*, 138(2), pp. 125–140.
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Mongioì, L. M., La Vignera, S. y Calogero, A. E. (2020) "Molecular biology of spermatogenesis: novel targets of apparently idiopathic male infertility", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5): 1728.
- Chen, S. R. y Liu, Y. X. (2015) "Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling", *Reproduction*, 149(4), pp. R159–R167.
- Comizzoli, P. y Holt, W. V. (2014) "Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 753, pp. 331–356.
- Costa, G. M. J., Avelar, G. F., Lacerda, S. M. S. N., Figueiredo, A. F. A., Tavares, A. O., Rezende-Neto, J. V., Martins, F. G. P. y França, L. R. (2017) "Horse spermatogonial stem cell cryopreservation: feasible protocols and potential biotechnological applications", *Cell and Tissue Research*, 370(3), pp. 489–500.
- Devi, L. y Goel, S. (2016) "Fertility preservation through gonadal cryopreservation", *Reproductive Medicine and Biology*, 15(4), pp. 235–251.
- Dietrich, A. J., Scholten, R., Vink, A. C. y Oud, J. L. (1983) "Testicular cell suspensions of the mouse *in vitro*", *Andrologia*, 15(3), pp. 236–246.
- Du, L., Chen, W., Cheng, Z., Wu, S., He, J., Han, L., Qin, W. y He, Z. (2021) "Novel gene regulation in normal and abnormal spermatogenesis", *Cells*, 10(3): 666.
- Endo, T., Mikedis, M. M., Nicholls, P. K., Page, D. C. y de Rooij, D. G. (2019) "Retinoic acid and germ cell development in the ovary and testis", *Biomolecules*, 9(12): 775.
- Faure, A., Bouty, A., O'Brien, M., Thorup, J., Hutson, J. y Heloury, Y. (2016) "Testicular biopsy in prepubertal boys: A worthwhile minor surgical procedure?", *Nature Reviews Urology*, 13(3), pp. 141–150.
- Fayomi, A. P. y Orwig, K. E. (2018) "Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men", *Stem Cell Research*, 29, pp. 207–214.
- Fell, H. B. y Robison, R. (1929) "The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated *in vitro*", *Biochemical Journal*, 23(4), pp. 767-784.
- Fléchon, J. E. (2016) "The acrosome of eutherian mammals", *Cell and Tissue Research*, 363(1), pp. 147–157.
- Gewiss, R., Topping, T. y Griswold, M. D. (2020) "Cycles, waves, and pulses: Retinoic acid and the organization of spermatogenesis", *Andrology*, 8(4), pp. 892–897.

- Hue, D., Staub, C., Perrard-Sapori, M. H., Weiss, M., Nicolle, J. C., Vigier, M. y Durand, P. (1998) "Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules", *Biology of Reproduction*, 59(2), pp. 379–387.
- Ibtisham, F. y Honaramooz, A. (2020) "Spermatogonial stem cells for *in vitro* spermatogenesis and *in vivo* restoration of fertility", *Cells*, 9(3): 745.
- Iwanami, Y., Kobayashi, T., Kato, M., Hirabayashi, M. y Hochi, S. (2006) "Characteristics of rat round spermatids differentiated from spermatogonial cells during co-culture with Sertoli cells, assessed by flow cytometry, microinsemination and RT-PCR", *Theriogenology*, 65(2), pp. 288–298.
- Kanbar, M., Delwiche, G. y Wyns, C. (2022) "Fertility preservation for prepubertal boys: are we ready for autologous grafting of cryopreserved immature testicular tissue?", *Annales d'Endocrinologie*, 83(3), pp. 210–217.
- Komeya, M., Hayashi, K., Nakamura, H., Yamanaka, H., Sanjo, H., Kojima, K., Sato, T., Yao, M., Kimura, H., Fujii, T. y Ogawa, T. (2017) "Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis *in vitro*", *Scientific Reports*, 7: 15459.
- Komeya, M., Kimura, H., Nakamura, H., Yokonishi, T., Sato, T., Kojima, K., Hayashi, K., Katagiri, K., Yamanaka, H., Sanjo, H., Yao, M., Kamimura, S., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Fujii, T. y Ogawa, T. (2016) "Long-term *ex vivo* maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device", *Scientific Reports*, 6: 21472.
- Komeya, M., Sato, T. and Ogawa, T. (2018) "*In vitro* spermatogenesis: a century-long research journey, still half way around", *Reproductive Medicine and Biology*, 17(4), pp. 407–420.
- Kubota, H. y Brinster, R. L. (2018) "Spermatogonial stem cells", *Biology of Reproduction*, 99(1), pp. 52–74.
- Lacerda, S. M. dos S. N., Costa, G. M. J. y de França, L. R. (2014) "Biology and identity of fish spermatogonial stem cell", *General and Comparative Endocrinology*, 207, pp. 56–65.
- Law, N. C., Oatley, M. J. y Oatley, J. M. (2019) "Developmental kinetics and transcriptome dynamics of stem cell specification in the spermatogenic lineage", *Nature Communications*, 10(1): 2787.
- Lee, J. H., Kim, H. J., Kim, H., Lee, S. J. y Gye, M. C. (2006) "*In vitro* spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix", *Biomaterials*, 27(14), pp. 2845–2853.
- Lima, D. B. C., da Silva, L. D. M., Marinari, P. y Comizzoli, P. (2020) "Long-term preservation of testicular tissue integrity and viability using vitrification in the endangered black-footed ferret (*Mustela nigripes*)", *Animals*, 10(10): 1865.
- Le Magueresse-Battistoni, B., Gérard, N. y Jégou, B. (1991) "Pachytene spermatocytes can achieve meiotic process *in vitro*", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179(2), pp. 1115–1121.
- Mäkelä, J. A., Koskenniemi, J. J., Virtanen, H. E. y Toppari, J. (2019) "Testis development", *Endocrine Reviews*, 40(4), pp. 857–905.
- Marh, J., Tres, L. L., Yamazaki, Y., Yanagimachi, R. y Kierszenbaum, A. L. (2003) "Mouse round spermatids developed *in vitro* from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into *in vivo*-developed mature oocytes", *Biology of Reproduction*, 69(1), pp. 169–176.
- Martinovitch, P. N. (1937) "Development *in vitro* of the mammalian gonad", *Nature*, 139, p. 413.
- Medrano, J. V., Vilanova-Pérez, T., Fornés-Ferrer, V., Navarro-Gomezlechón, A., Martínez-Triguero, M. L., García, S., Gómez-Chacón, J., Povo, I., Pellicer, A., Andrés, M. M. y Novella-Maestre, E. (2018) "Influence of temperature, serum, and gonadotropin supplementation in short- and long-term organotypic culture of human immature testicular tissue", *Fertility and Sterility*, 110(6), pp. 1045-1057.
- De Michele, F., Poels, J., Giudice, M. G., De Smedt, F., Ambroise, J., Vermeulen, M., Gruson, D. y Wyns, C. (2018a) "*In vitro* formation of the blood-testis barrier during long-term organotypic culture of human prepubertal tissue: comparison with a large cohort of pre/peripubertal boys", *Molecular Human Reproduction*, 24(5), pp. 271–282.
- De Michele, F., Poels, J., Vermeulen, M., Ambroise, J., Gruson, D., Guiot, Y. y Wyns, C. (2018b) "Haploid germ cells generated in organotypic culture of testicular tissue from prepubertal boys", *Frontiers in Physiology*, 9: 1413.

- De Michele, F., Poels, J., Weerens, L., Petit, C., Evrard, Z., Ambroise, J., Gruson, D. y Wyns, C. (2017) "Preserved seminiferous tubule integrity with spermatogonial survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue", *Human Reproduction*, 32(1), pp. 32–45.
- Miller, S. R. y Cherrington, N. J. (2018). "Transepithelial transport across the blood–testis barrier", *Reproduction*, 156(6), pp. R187-R194.
- Mruk, D. D. y Cheng, C. Y. (2015) "The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation", *Endocrine Reviews*, 36(5), pp. 564–591.
- Nóbrega, R. H., Greebe, C. D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L. R. y Schulz, R. W. (2010) "Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish", *PLoS ONE*, 5(9): e12808.
- O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., López-Sebastián, A., Martínez-Navado, E., Guerra, R., López Fernández, M., Vega, R. S., Guillamón, F. G. y Santiago-Moreno, J. (2019) "Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means", *Theriogenology*, 129, pp. 160–167.
- Patra, T., Pathak, D. y Gupta, M. K. (2021) "Comparison of two culture methods during *in vitro* spermatogenesis of vitrified-warmed testis tissue: organ culture vs. hanging drop culture", *Cryobiology*, 100(February), pp. 142–150.
- Picton, H. M., Wyns, C., Anderson, R. A., Goossens, E., Jahnukainen, K., Kliesch, S., Mitchell, R. T., Pennings, G., Rives, N., Tournaye, H., Van Pelt, A. M. M., Eichenlaub-Ritter, U. y Schlatt, S. (2015) "A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys", *Human Reproduction*, 30(11), pp. 2463–2475.
- Portela, J. M. D., De Winter-Korver, C. M., Van Daalen, S. K. M., Meißner, A., De Melker, A. A., Repping, S. y Van Pelt, A. M. M. (2019) "Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre)pubertal boys during organ culture as a strategy for *in vitro* spermatogenesis", *Human Reproduction*, 34(12), pp. 2443–2455.
- Ramm, S. A., Schärer, L., Ehmecke, J. y Wistuba, J. (2014) "Sperm competition and the evolution of spermatogenesis", *Molecular Human Reproduction*, 20(12), pp. 1169–1179.
- Reis, M. M. S., Moreira, A. C., Sousa, M., Mathur, P. P., Oliveira, P. F. y Alves, M. G. (2015) "Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: advantages and disadvantages", *Journal of Applied Toxicology*, 35(8), pp. 870–883.
- Rodríguez-Casuriaga, R. y Geisinger, A. (2021) "Contributions of flow cytometry to the molecular study of spermatogenesis in mammals", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3): 1151.
- Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y. y Ogawa, T. (2011) "*In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes", *Nature*, 471(7339), pp. 504–508.
- Sato, T., Katagiri, K., Kojima, K., Komeya, M., Yao, M. y Ogawa, T. (2015) "*In vitro* spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues", *PLoS ONE*, 10(6): e0130171.
- Schlatt, S. y Ehmecke, J. (2014) "Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective", *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 29, pp. 2–16.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H. y Miura, T. (2010) "Spermatogenesis in fish", *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), pp. 390–411.
- Shah, W., Khan, R., Shah, B., Khan, A., Dil, S., Liu, W., Wen, J. y Jiang, X. (2021) "The molecular mechanism of sex hormones on Sertoli cell development and proliferation", *Frontiers in Endocrinology*, 12(July): 648141.
- Sharma, S., Wistuba, J., Pock, T., Schlatt, S. y Neuhaus, N. (2019) "Spermatogonial stem cells: updates from specification to clinical relevance", *Human Reproduction Update*, 25(3), pp. 275–297.
- Silva, A. F., Escada-Rebelo, S., Amaral, S., Tavares, R. S., Schlatt, S., Ramalho-Santos, J. y Mota, P. C. (2018) "Can we induce spermatogenesis in the domestic cat using an *in vitro* tissue culture approach?", *PLoS ONE*, 13(2): e0191912.

- Silva, A. M. Da, Pereira, A. F., Comizzoli, P. y Silva, A. R. (2020) "Cryopreservation and culture of testicular tissues: an essential tool for biodiversity preservation", *Biopreservation and Biobanking*, 18(3), pp. 235–243.
- Singh, R. P., Escobar, E., Wildt, D., Patel, S., Costa, G. M. J. y Pukazhenthil, B. (2019) "Effect of sphingosine-1-phosphate on cryopreserved sheep testicular explants cultured *in vitro*", *Theriogenology*, 128, pp. 184–192.
- Staub, C., Hue, D., Nicolle, J. C., Perrard-Sapori, M. H., Segretain, D. y Durand, P. (2000) "The whole meiotic process can occur *in vitro* in untransformed rat spermatogenic cells", *Experimental Cell Research*, 260(1), pp. 85–95.
- Steinberger, E., Steinberger, A. y Perloff, W. H. (1964) "Studies on growth in organ culture of testicular tissue from rats of various ages", *The Anatomical Record*, 148(4), pp. 581–589.
- Steinberger, E., Steinberger, A. y Perloff, W. H. (1964) "Initiation of spermatogenesis *in vitro*", *Endocrinology*, 74, pp. 788–792.
- Stukenborg, J. B., Schlatt, S., Simoni, M., Yeung, C. H., Elhija, M. A., Luetjens, C. M., Huleihel, M. y Wistuba, J. (2009) "New horizons for *in vitro* spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells", *Molecular Human Reproduction*, 15(9), pp. 521–529.
- Stukenborg, J. B., Wistuba, J., Luetjens, C. M., Elhija, M. A., Huleihel, M., Lunenfeld, E., Gromoll, J., Nieschlag, E. y Schlatt, S. (2008) "Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional Soft-Agar-Culture-System", *Journal of Andrology*, 29(3), pp. 312–329.
- Suzuki, S. y Sato, K. (2003) "The fertilising ability of spermatogenic cells derived from cultured mouse immature testicular tissue", *Zygote*, 11(4), pp. 307–316.
- Tharmalingam, M. D., Jorgensen, A. y Mitchell, R. T. (2018) "Experimental models of testicular development and function using human tissue and cells", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 468, pp. 95–110.
- Tres, L. L. y Kierszenbaum, A. L. (1983) "Viability of rat spermatogenic cells *in vitro* is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone-supplemented medium", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(11 I), pp. 3377–3381.
- Trowell, O. (1959) "The culture of mature organs", *Cell Research*, 147, pp. 118–147.
- Varuzhanyan, G. y Chan, D. C. (2020) "Mitochondrial dynamics during spermatogenesis", *Journal of cell science*, 133(14): jcs235937.
- Walker, W. H. (2021) "Androgen actions in the testis and the regulation of spermatogenesis", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1288, pp. 175–203.
- Wang, P., Suo, L. J., Shang, H., Li, Y., Li, G. X., Li, Q. W. y Hu, J. H. (2014) "Differentiation of spermatogonial stem cell-like cells from murine testicular tissue into haploid male germ cells *in vitro*", *Cytotechnology*, 66(3), pp. 365–372.
- Wyns, C., Kanbar, M., Giudice, M. G. y Poels, J. (2021) "Fertility preservation for prepubertal boys: lessons learned from the past and update on remaining challenges towards clinical translation", *Human reproduction update*, 27(3), pp. 433–459.
- Xie, X., Nóbrega, R. y Pšenička, M. (2020) "Spermatogonial stem cells in fish: characterization, isolation, enrichment, and recent advances of *in vitro* culture systems", *Biomolecules*, 10(4): 644.
- Yokonishi, T. y Ogawa, T. (2016) "Cryopreservation of testis tissues and *in vitro* spermatogenesis", *Reproductive Medicine and Biology*, 15(1), pp. 21–28.
- Yokonishi, T., Sato, T., Katagiri, K., Komeya, M., Kubota, Y. y Ogawa, T. (2013) "*In vitro* reconstruction of mouse seminiferous tubules supporting germ cell differentiation", *Biology of Reproduction*, 89(1): 15.
- Yokonishi, T., Sato, T., Komeya, M., Katagiri, K., Kubota, Y., Nakabayashi, K., Hata, K., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A. y Ogawa, T. (2014) "Offspring production with sperm grown *in vitro* from cryopreserved testis tissues", *Nature Communications*, 5: 4320.

Yu, K., Zhang, Y., Zhang, B. L., Wu, H. Y., Jiang, W. Q., Wang, S. T., Han, D. P., Liu, Y. X., Lian, Z. X. y Deng, S. L. (2019) "*In-vitro* differentiation of early pig spermatogenic cells to haploid germ cells", *Molecular Human Reproduction*, 25(9), pp. 507–518.

Zheng, P., Zhao, X. W., Zheng, X. M., Khalid, A., Zhao, Q. y Zhang, G. X. (2015) "*In vitro* differentiation of sperm from male germline stem cell", *Genetics and Molecular Research*, 14(2), pp. 2964–2969.