

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida

**Maduración de la espermatogénesis *in vitro*:
Preservación y tratamiento de la infertilidad
masculina**

Autor: Manuel Jiménez González
Tutor: Antonio Jesús Cejudo Román

Alcobendas, Septiembre 2022

1. Índice

Resumen y Palabras Clave	3
Introducción.....	4
a. Autotrasplante de tejido testicular inmaduro.....	8
b. Autotrasplante de SSC aisladas	8
c. Espermatogénesis <i>in vitro</i>	10
Hipótesis y Objetivos	12
Materiales y Métodos	13
Resultados.....	14
A. Estudios coincidentes en el uso de sistemas de cultivo de organotípicos	15
B. Maduración <i>in vitro</i> utilizando sistemas de cultivo con SSC aisladas	18
Discusión	23
a. Eficiencia de la técnica	23
b. Sistemas de cultivo	24
c. Aplicabilidad en humanos	25
d. Aproximaciones futuras.....	25
Conclusiones.....	28
Bibliografía.....	29

2. Resumen y Palabras Clave

La azoospermia no obstructiva o secretora es un caso grave de infertilidad masculina que afecta a pacientes que buscan tratamientos de reproducción asistida. Este tipo de azoospermia puede tener diferentes orígenes: Se presenta intrínsecamente en el paciente (debido a un factor genético, inmunológico o endocrino) o es adquirido debido a un factor ambiental. Uno de los pacientes afectados por este último tipo de azoospermia son aquellos varones prepúberes que deben pasar por terapias como la quimio o radioterapia para tratar una patología oncológica. Debido a los efectos secundarios gonadotóxicos de estas terapias, las células madre espermatogénicas son eliminadas. Sin embargo, tras la criopreservación de tejido testicular antes de estas terapias, los hace los pacientes ideales a diversos tratamientos experimentales que podrían ser capaces de restaurar su fertilidad. La más prometedora de ellas consiste en la maduración células madre espermatogénicas *in vitro*, logrando su completa espermatogénesis. Gracias a esta técnica, cualquier tipo de paciente con azoospermia secretora puede optar por preservar sus células madre para madurarlas en el futuro y utilizar estos espermatozoides maduros para tratamientos de reproducción asistida. Sin embargo, esta técnica aún es prematura y se encuentra en fase experimental desde hace varias décadas. En este proyecto hablamos sobre los avances de esta técnica, explorando sus últimos descubrimientos, así como los retos que aún se deben de estudiar antes de poder llevar esta innovadora técnica a la clínica de fertilidad.

Palabras Clave: espermatogénesis *in vitro*, células madre espermatogénicas, preservación de la fertilidad, infertilidad masculina, espermatozoides, cáncer infantil.

3. Introducción

La infertilidad es un problema sanitario grave que afecta a escala global. Considerada la segunda enfermedad que causa más infelicidad de todas, puede repercutir enormemente en el desarrollo psicosocial del paciente individual como de las parejas afectadas. De todas las parejas sexualmente activas, alrededor de un 12-15% son infértiles. De estos casos de infertilidad, aproximadamente la mitad se debe a un factor del varón o en combinación con la pareja femenina (1).

Dentro de estos casos de infertilidad de causa masculina, un 10% son pacientes cuyas muestras de semen carecen completamente de espermatozoides. Estos pacientes reciben la designación de azoospermicos (2). La azoospermia es un tipo severo de infertilidad masculina y esta puede ser de dos tipos: Tipo obstructivo en el caso de que los espermatozoides existan, solo que se encuentran en los testículos y/o epidídimo y debido a diversos motivos no salen en el eyaculado. No obstante, existe un tipo de azoospermia llamada azoospermia no obstructiva o secretora, en este caso los testículos del paciente no son capaces de producir espermatozoides, por tanto, no se encontrarán en biopsias de testículo ni de epidídimo.

Este tipo de causa de infertilidad masculina puede venir por múltiples factores, ya sean genéticos o medioambientales. Las causas de esta azoospermia pueden venir por razones de tipo endocrino o hipogonadismos, muchas de estas causas son tratables. Existen diferentes tipos de azoospermia secretora según su histopatología: Aquellos que no poseen ninguna célula germinal; Aquellos cuyas células madre se encuentren en arresto mitótico; Aquellas cuyas células madre se encuentren en arresto premeiótico (3).

Entre estos pacientes con azoospermia no obstructiva se incluyen aquellos pacientes que han pasado por un tratamiento gonadotóxico para tratar algunas patologías como son las oncológicas, endocrinas o incluso autoinmunes.

Los pacientes varones adultos que se ven sometidos a terapia con efectos gonadotóxicos pierden la función testicular. Esto se debe a que la mayoría de las terapias para enfermedades oncológicas se basan en la destrucción de células que se encuentran en constante división celular. Estas serían las células cancerosas, pero también muchos tipos de células madre que se encuentran activas como son las llamadas Células Madre Espermatogénicas, en inglés se conocen como SSC (Spermatogonial Stem Cells). Tras la

pubertad, las SSC obtienen la habilidad de transformarse en dos tipos de espermatogonias tipo A: A-oscura cuya función es reponer las SSCs mediante la mitosis y las A-pálidas que se encargan realizar la meiosis y diferenciarse en espermatocitos y finalmente en espermatozoides (Figura 1).

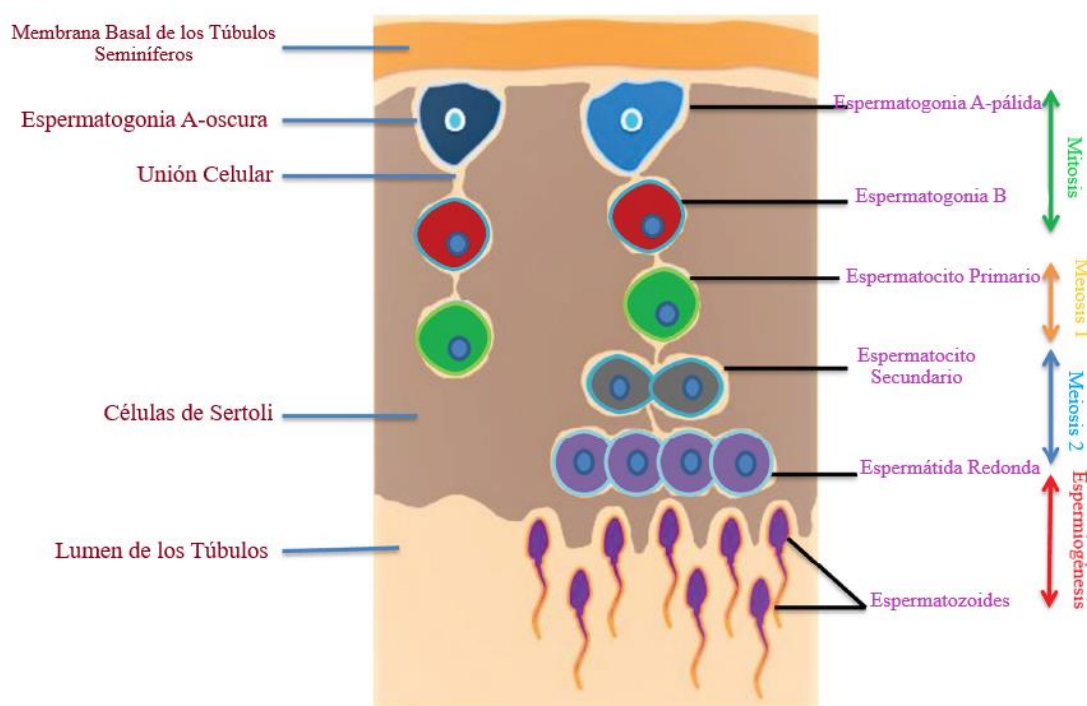


Figura 1. La espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos. Según la célula madre se va diferenciando, irá desplazándose desde la base de la membrana de los túbulos hasta su lumen. Mientras que las espermatogonias A-oscuras mantienen la población de espermatogonias constante, las A-pálidas se diferencian en espermatogonias B mediante mitosis. Las espermatogonias B (células diploides) se diferencian en espermatocitos primarios (diploides) y estas células dan comienzo a la meiosis 1 que concluye con la generación de espermatocitos secundarios (haploides). Posteriormente, tras la meiosis 2, se producen las espermátidas redondas (haploides). Las espermátidas redondas maduran a espermatozoides mediante el proceso de la espermiogénesis. *Ibtisham F et al. Oncotarget. 2017*

La destrucción de estas células impide la generación de espermatozoides comprometiendo la fertilidad de estos pacientes. Es por ello por lo que se ven forzados a emplear técnicas de preservación de su fertilidad con anterioridad al tratamiento gonadotóxico si desean tener descendencia en el futuro. La técnica más usada es la criopreservación de espermatozoides. De esta manera, tras el tratamiento, los espermatozoides podrán usarse para técnicas de reproducción asistida como FIV o ICSI.

Ciertos tipos de cáncer poseen un riesgo incrementado de azoospermia o disminución de los parámetros seminales principales incluso antes de iniciar el tratamiento. En la literatura, existen estudios que demuestran que afecciones como la leucemia y algunos tipos de linfomas son factores de riesgo para azoospermia. Incluso antes del tratamiento

gonadotóxico. A su vez, diversos estudios han comparado los parámetros seminales en pacientes varones adultos con cáncer testicular con pacientes afectados con otras patologías oncológicas, demostrando que dichos parámetros son inferiores en caso de cáncer testicular (4). Los mecanismos postulados de esta baja calidad son varios: Producción de anticuerpos anti-esperma, producción anómala de hormonas sexuales en caso de cáncer testicular y otros tipos de tumor como aquellas que afectan al drenaje venoso pueden provocar un varicocele secundario, lo cual provoca un aumento de la temperatura en el testículo que inhibe la espermatogénesis. En todo caso, la situación de alto gasto metabólico que provoca el tumor puede acabar produciendo sustancias gonadotóxicas(1).

Por desgracia, existen pacientes varones que deben pasar por estas terapias gonadotóxicas antes de que puedan generar sus propios espermatozoides de manera natural: Los niños prepúberes oncológicos. El tejido testicular de estos pacientes prepúberes es especialmente sensible a la radiación y a la quimioterapia debido a la constante actividad mitótica de las espermatogonias indiferenciadas. De todos modos, en testículos post-puberales las espermatogonias pueden agotarse con dosis bajas de quimioterapia o radiación, y por ello también acaban por agotarse las células en estadios posteriores provocando una oligozoospermia o incluso azoospermia que genera un fallo testicular prematuro(5).

Existe una evaluación de la madurez sexual mediante la observación del desarrollo físico de niños, adolescentes y adultos que se conoce como Escala de Tanner. Los niños que se encuentren en estadio puberal de Tanner III, en teoría, son lo suficientemente maduros física y mentalmente para depositar una muestra de semen mediante masturbación para así crioconservar la muestra y utilizarse en el futuro para técnicas de reproducción asistida. El problema se da cuando la patología aparece antes de que se alcance este estadio(6). Por el contrario, aunque el niño se encuentre en este estadio ello no indica que ya el testículo ha madurado lo suficiente para producir espermatozoides, por no hablar las posibles limitaciones culturales y religiosas junto al estrés producido por la patología(1).

Debido al avance en estas terapias (radioterapia, quimioterapia, cirugía, trasplante de médula ósea...) y a la creciente mejora de la detección temprana de estas patologías oncológicas, el porcentaje de supervivencia de los pacientes a los 5 años, tanto pre como

postpuberales, es actualmente del 80-84%(4). Estos datos han logrado que se reflexione aún más en la calidad de vida post-tratamiento de los pacientes, incluyendo la posibilidad de que se dé una infertilidad provocada por una insuficiencia testicular resultante tras el tratamiento.

Esta insuficiencia testicular provoca que los niños prepúberes pierdan sus SSC, lo que imposibilita la maduración de espermatozoides propios en un futuro. Mientras que no es posible criopreservar el espermatozoides de estos pacientes, actualmente solo tienen dos posibilidades de preservar su fertilidad:

1. Minimizar el daño testicular o proteger las SSCs *in vivo* mediante técnicas como el escudo testicular o cirugía de transposición testicular (mediante cirugía se desplaza el testículo a una zona del cuerpo alejado de la zona que será irradiada).
2. Crioconservar una biopsia testicular con esperanza de poder disponer de sus SSCs en el futuro para restaurar su fertilidad. Ante este paradigma, los enfoques experimentales que trabajan en la restauración de la fertilidad en varones prepúberes afectados de patologías oncológicas mediante el uso de SSC son (Figura 2):

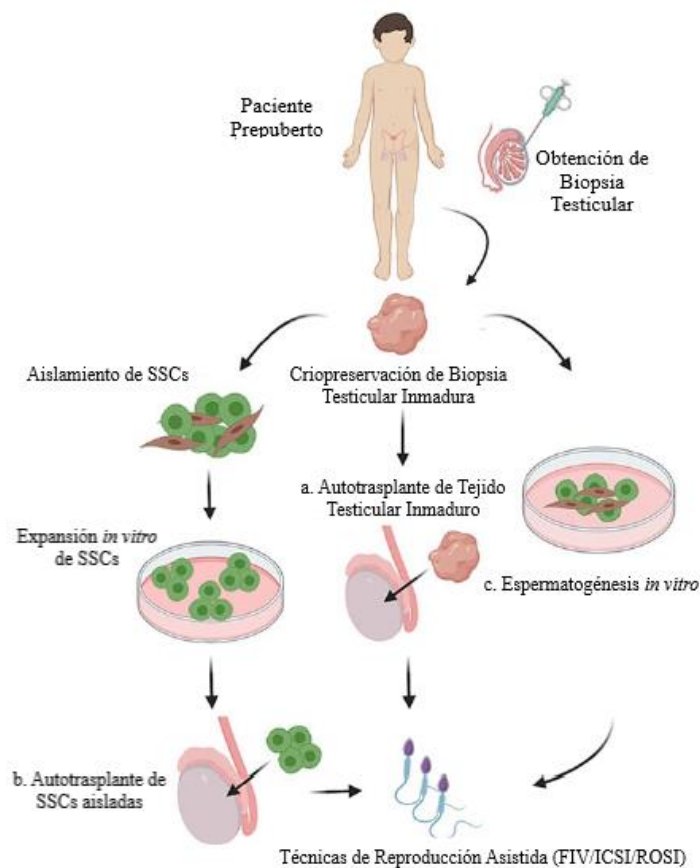


Figura 2. Técnicas experimentales de restauración de la fertilidad masculina mediante uso de SSC. Los siguientes apartados se corresponden con la figura: El apartado a) corresponde con Trasplante de tejido testicular inmaduro. El apartado b) se corresponde con el trasplante de SSCs aisladas. El apartado c) se corresponde con la maduración de gametos *in vitro*. Modificado de *Martin-Inaraja M et al. Challenges of Stem Cell Therapies for The Treatment of Infertility in Reproductive Medicine, Stem Cells in Reproductive Tissues and Organs: from Fertility to Cancer, Book Springer 2021.*

a. Autotrasplante de tejido testicular inmaduro

Uno de los enfoques consiste en criopreservar un injerto de testículo del niño antes de realizar el tratamiento gonadotóxico y reimplantarlo debajo de la piel (subcutánea) o directamente en la zona del testículo tras el tratamiento. Así es posible recolectar las espermátidas resultantes de la maduración en dicho injerto una vez reimplantado.

Al conservar la estructura testicular interna, y a través de la angiogénesis producida tras el reimplante, el tejido recibe las señales endocrinas que forman parte del microambiente necesario para permitir la espermatogénesis. En consecuencia, las espermátidas pueden recuperarse del injerto reimplantado para usarlas en técnicas de reproducción asistida como ICSI(7).

Estudios de este sistema han logrado iniciar la espermatogénesis mediante trasplantes autólogos o xenoautólogos en ratones y primates no humanos. No obstante, el xenotrasplante de tejido testicular humano en testículos de ratón no ha logrado producir espermátidas, aunque sí se ha logrado que las células inicien la meiosis(7).

Destacamos que esta técnica tiene la potencialidad de reintroducir células cancerígenas de vuelta al paciente. Esto es especialmente probable en aquellos casos donde la patología oncológica sea un seminoma o un linfoma(8). Añadimos que esta técnica no puede restaurar la fertilidad aquellos pacientes adultos con azoospermia secretora cuyos testículos no sean capaces de realizar la espermatogénesis, como es el caso del Síndrome de Klinefelter, ya que presentan un fallo testicular desde el primer momento.

Además, no existen estudios que evalúen la estabilidad (epi)genética de estas células tras ser trasplantadas. Es posible que esta sea una de las razones por las que no se ha tenido éxito de esta técnica en humanos(7).

b. Autotrasplante de SSCs aisladas

Otro acercamiento en la restauración de la fertilidad consiste en la conservación de una biopsia de testículo antes del tratamiento, asilamiento de las SSCs y su posterior trasplante autólogo de vuelta al testículo del paciente tras terminar su tratamiento. Tras el trasplante,

estas células son capaces de migrar a la base de los túbulos seminíferos donde iniciarán la formación de los espermatozoides, lo que permitiría, idealmente, reestablecer la capacidad de generar descendencia mediante concepción natural(1) (Figura 3).

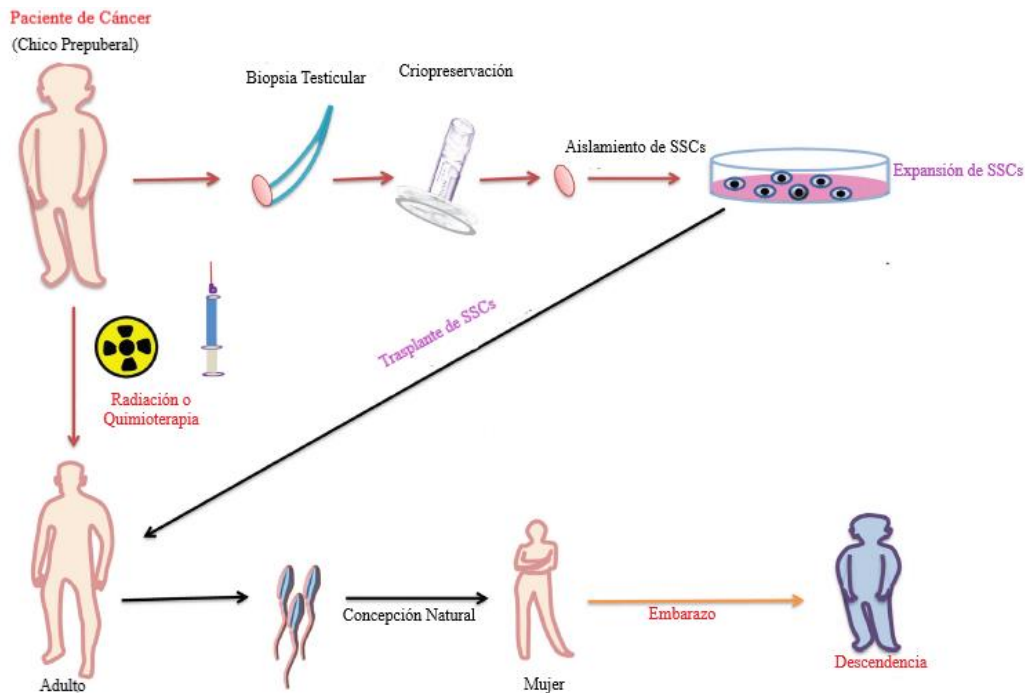


Figura 3. Esquema de la técnica de trasplante de SSC con objetivo de restauración de la fertilidad. Tal y como se representa, la técnica tiene el potencial de lograr la concepción natural en casa. Modificado de *Ibtisham F et al. Oncotarget. 2017*

Esta técnica ha demostrado su eficiencia en ratones donde se logró establecer la colonización y espermatogénesis de SSC de los que se consiguió descendencia con éxito. Desde entonces, el trasplante de SSC se ha logrado en especies animales de roedores, no roedores, e incluso en primates no humanos. En todos se ha logrado una espermatogénesis funcional (7).

En humanos, aunque esta técnica está avanzada, aún no se han establecido ensayos clínicos con este tipo de trasplante. Además, esta técnica requiere de altas cantidades de SSC para una eficiencia óptima. Hay que añadir que, gracias a los ensayos en ratones, la concentración de las SSCs disminuye con el tiempo, lo que suponen grandes limitaciones importantes en los pacientes más jóvenes si no se actúa a tiempo antes del tratamiento gonadotóxico (8). Debido a ello sería necesario expandir estas células *in vitro* dificultando aún más la técnica.

Existe otra limitación en el sentido de que no existe consenso de marcadores celulares específicos para SSCs humanas *in vivo* e *in vitro* (7). La identificación y separación de las SSCs es crucial en el trasplante, aún más en casos oncológicos, y no se lograría sin un buen método de identificación de estas células.

Al igual que la técnica anterior, este trasplante conlleva el riesgo de reintroducir células cancerígenas de vuelta al cuerpo. Esto podría darse sobre todo en caso de cánceres testicular o linfomas, asimismo no puede descartarse problemas de inestabilidad genética tras la criopreservación y el cultivo *in vitro* de estas células.

c. Espermatogénesis *in vitro*

Otra de las técnicas propuestas para la restauración de la fertilidad en estos pacientes es la replicación de las espermatogénesis y cultivo de espermatozoides maduros *in vitro*.

La técnica consiste en simular el microambiente del nicho testicular necesario para que se dé la espermatogénesis completa directamente de las SSCs recuperadas del paciente. Esto permite su uso para técnicas de reproducción asistida posteriores como FIV e ICSI (Figura 4).

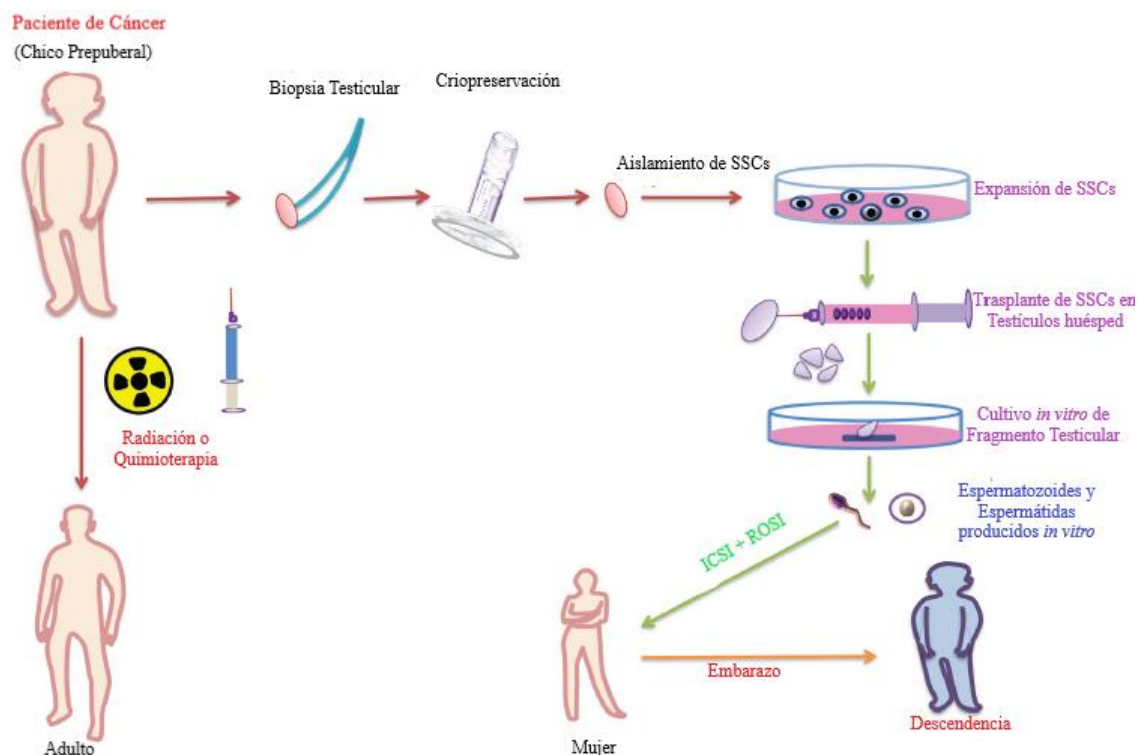


Figura 4. Esquema del proceso de maduración *in vitro* de las SSCs y su aplicación en pacientes oncológicos. La principal ventaja de esta técnica es que no reintroduce ningún tipo de célula de vuelta al paciente. Modificado de Ibtisham F et al. *Oncotarget*. 2017

Existen dos posibles acercamientos experimentales en la maduración de las SSCs *in vitro*, las cuáles explicaremos de manera extendida a lo largo del trabajo:

1. Recuperar las SSCs aisladas de tejido testicular y posteriormente lograr su mantenimiento y diferenciación en un medio de cultivo celular.
2. Recuperar fragmentos de testículo que contengan SSCs, mantenerlas y diferenciarlas en los túbulos seminíferos del fragmento en un medio de cultivo de órganos.

Esta técnica tiene la gran ventaja sobre las anteriores de que no posee el riesgo de la reintroducción de células maligna en el cuerpo del paciente porque solo obtendremos espermatozoides maduros.

Los resultados de esta técnica sugieren aplicaciones como la restauración de la fertilidad de estos pacientes prepúberes oncológicos y ha sembrado la semilla de la posible aplicación al tratamiento de la infertilidad de todos aquellos pacientes con azoospermia no obstructiva o secretora que posean SSCs viables en sus testículos . En este tipo de paciente, debido a una alteración del microambiente testicular, los testículos no tienen la capacidad de llevar a cabo la espermatogénesis por lo que un trasplante de SSC no daría resultado (9).

Esto sitúa a la técnica como aquella más prometedora y ambiciosa a la que hemos dedicado este trabajo, en el que profundizaremos en ventajas y limitaciones de los principales estudios de los últimos años.

4. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis:

¿Es la espermatogénesis *in vitro* una técnica capaz de restaurar la fertilidad de aquellos pacientes con azoospermia no obstructiva o secretora?

Objetivos:

1. Distinguir las diferentes aproximaciones para lograr una completa espermatogénesis *in vitro*.
2. Aprender sobre el origen y el avance de las primeras aproximaciones hasta la actualidad.
3. Identificar cuáles son las limitaciones de estas técnicas en la actualidad.
4. Determinar si estas técnicas están lo suficientemente avanzadas y son seguras para ensayos clínicos en humanos.

5. Materiales y Métodos

Para la recopilación de estudios de este trabajo se realizó una búsqueda sistemática de las siguientes bases de datos: Medline, Pubmed, Web of Science (WOS) y Scopus.

Antes de introducir los términos de búsqueda se introdujeron las siguientes limitaciones:

- Rango de fecha: 2011-2022.
- Limitado a texto completo y selección de artículos experimentales y de revisión bibliográfica.
- Idioma: inglés o español.

Se introdujeron los siguientes tipos de términos en la búsqueda y se obtuvieron los siguientes resultados:

Base de datos	Términos de búsqueda	Número de artículos
Medline	<i>In vitro</i> spermatogenesis	412
Medline	<i>In vitro</i> spermatogenesis AND fertility restoration	14
Pubmed	<i>In vitro</i> spermatogenesis	1057
Pubmed	<i>In vitro</i> spermatogenesis AND fertility restoration	31
Scopus	<i>In vitro</i> spermatogenesis	1335
Scopus	<i>In vitro</i> spermatogenesis AND fertility restoration	27
WOS	<i>In vitro</i> spermatogenesis	2291
WOS	<i>In vitro</i> spermatogenesis AND fertility restoration	32

En la selección final, muchos de estos artículos científicos coincidían en las diferentes bases de datos. Se seleccionaron un total de 19 artículos.

6. Resultados

La espermatogénesis es un proceso altamente organizado de proliferación celular que tiene lugar en los túbulos seminíferos cuyo resultado concluye con la formación de espermatozoides maduros.

Tras analizar los diferentes artículos de investigación y revisiones bibliográficas de los últimos años, podemos clasificar los diferentes acercamientos en dos grandes grupos (Figura 5):

- A. Un grupo trata sobre investigaciones que usaron piezas enteras de testículo, conservando su tejido conectivo y estructura tridimensional. Coinciden el uso de sistemas de cultivo de tipo organotípicos.
- B. Otro grupo cuyas investigaciones coincidían en el uso de SSCs aisladas para luego diferenciarlas en medios de cultivo celular para recrear el proceso espermatogénico completo.

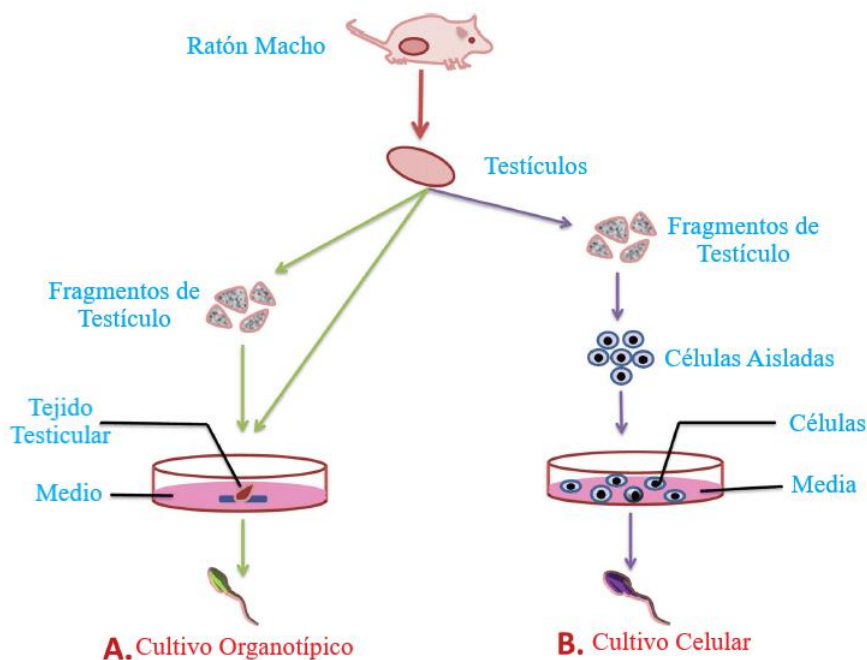


Figura 5. División de los tipos de maduración in vitro de SSC. Modificado de *Ibtisham F et al. Oncotarget. 2017*

Destacamos que los estudios que usan piezas de testículo no siempre coinciden en el estadio de maduración. Mientras que unos utilizaron tejidos de testículo prepuberal, de modo que así se asegura que las células que contienen se encuentran en un estadio temprano de la espermatogénesis, otros utilizaron tejido testicular adulto que contuvieron células germinales en todos los estadios de diferenciación. La temperatura de los medios

de cultivo, el cual se trata de un punto crítico entre los diferentes estudios también varía entre ellos pudiendo llegar desde los 32°C a los 37°C en aquellos casos más extremos (2).

A. Estudios coincidentes en el uso de sistemas de cultivo de organotípicos

En 1920 se realizó la primera diferenciación *in vitro* de células germinales usando cultivo de órganos. Tras esto, muchos otros intentos tratan de conseguir una diferenciación progresiva y completa de estas células (3). El principal beneficio de estas técnicas reside en que las células se encontraran en un ambiente que simula su disposición en el espacio de su microambiente usual.

El desafío de estas técnicas de cultivo era mantener viable el tejido testicular en el medio utilizado, pues a diferencia de los sistemas de cultivo de SSCs aisladas que veremos más adelante, la difusión interna de aquellos factores necesarios para el mantenimiento y diferenciación de las SSCs es más complejo.

En 1959 se consiguió mantener viable tejido testicular de rata a 37°C durante 6 días, utilizando el medio esencial de Eagle (MEM). Posteriormente se trató de suplementar este medio con diferentes concentraciones de hormona folículo estimulante (FSH), gonadotropina coriónica humana (hCG) y/o vitaminas A, C y E. La temperatura se bajó a 31°C. Esto resultó en un sistema que es capaz de mantener la espermatogénesis hasta 4 semanas sin alteraciones estructurales importantes. Sin embargo, no se consiguió la diferenciación de las células germinales vivas (2).

Para solucionar este problema, se trató de usar túbulos seminíferos de rata en lugar del testículo completo. Este cambio supuso que, tras 40 días en este medio de cultivo, más del 70% de las células haploides habían sobrevivido. Este medio contenía FBS (suero fetal bovino) (3). En el año 2000, el mismo grupo demostró la presencia de cada estadio de la espermatogénesis hasta la fase de espermátida redonda. Destacamos que, a los 21 días de cultivo, la proporción de espermátidas redondas fue menor al compararlas con la proporción que tenían ratas *in vivo* de 40 días de vida. Sin embargo, la proporción se asemeja mucho a la que cabría esperar en una rata de 30 días. Esto significa que, *in vivo*, durante la maduración puberal se incrementa la diferenciación, pero este suceso no se ha observado *in vitro*.

Dados los importantes resultados obtenidos al añadir FBS al sistema de cultivo, se trató de constatar qué componente poseía este suero para promover la espermatogénesis. El medio poseía concentraciones importantes de ácido retinoico, FSH y testosterona, elementos candidatos como determinantes en este proceso de diferenciación. Al cultivar fragmentos de testículo de ratón en medios de cultivo libres que contenían tan solo uno de los elementos nombrados, los resultados demostraron que estos elementos debían tener una acción sinérgica en la inducción de la espermatogénesis ya que no se obtuvieron células haploides en ninguno de los medios libres. De manera sorprendente, un ensayo cultivó estos fragmentos en FBS durante un solo día y al siguiente se pasaron medios cultivos libres, del cual sí fueron capaces de obtenerse células haploides (2).

De manera análoga a estos estudios, se ha propuesto que debe existir un flujo de fluido en el interior de los túbulos seminíferos que genere un gradiente de factores autocrinos y paracrinos en la cara basal, adluminal y luminal de estos túbulos, y que como resultado promueva el mantenimiento y diferenciación de estas células (10). Debido a que el tejido testicular es una compleja estructura tridimensional, este gradiente podría ser la clave necesaria que necesite un adecuado sistema de cultivo para este tipo de células.

Basándose en esta teoría se idearon sistemas de cultivo con base de gel de agarosa que simulan este flujo interno (Figura 6). En estudios realizados en 2011, el equipo liderado por Takehiko Ogawa hizo historia en este campo y logró conseguir espermátidas haploides (espermátidas redondas, elongadas y flageladas, estas últimas en menor proporción) a partir de fragmentos de testículos inmaduros de ratón en un sistema de base de gel de agarosa utilizando (11).

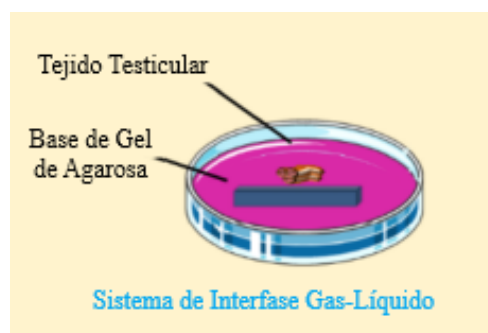


Figura 6. Representación del sistema de cultivo con base de gel de agarosa. Modificado de *Ibtisham F et al. Cells. 2020.*

La fertilidad de estas células se comprobó con las técnicas ICSI y ROSI (Inyección de espermátidas redondas), obteniendo mejores resultados que aquellos ensayos hechos con medio de cultivo utilizando tan solo FBS en el medio. El equipo logró obtener descendencia en los ratones a los que se transfirieron los embriones resultantes, y esta descendencia pudo, a su vez, reproducirse mediante concepción natural.

Así mismo, el mismo estudio repitió el ensayo utilizando muestras criopreservadas de fragmentos de testículo de ratón inmaduro obteniendo los mismos resultados, demostrando que la criopreservación de los fragmentos de testículo no tiene un impacto definido sobre la viabilidad de las SSCs en su maduración *in vitro* (12)

Añadimos que, aunque la eficiencia es comparable al testículo de ratón *in vivo*, solo se utilizó una línea de ratón y, por tanto, el ensayo realizado es de pequeña escala (11,13,14). Este ensayo acaba demostrando un potencial muy prometedor para su uso clínico en el futuro.

En cuanto a ensayos con células humanas, uno de los primeros ensayos fue en 1971. Mediante un sistema de cultivo simple para fragmentos testiculares, se cultivaron fragmentos de un paciente que debía pasar por una orquiectomía. Se consiguieron observar espermátidas redondas durante 32 días en un medio de cultivo que poseía un suplemento de 20% FBS, el cual es necesario su presencia en las etapas más tempranas de la espermatogénesis (2,15). Sin embargo, en ningún momento se consiguió la diferenciación de células haploides *in vitro*, y estas células murieron antes de alcanzar el estado elongado.

Desde un punto de vista clínico, en 1998 se trató de madurar biopsias testiculares de pacientes que padecen de azoospermia obstructiva o secretora de cariotipo normal, utilizando un sistema de cultivo simple enriquecido con FSH recombinante(16). Tras 24 horas, se identificaron espermátidas alargadas, aunque la mayoría fueron morfológicamente anormales. Se trató de comprobar su fertilidad mediante ICSI y ROSI. Aclaremos que antes del cultivo para su maduración, las células ya se encontraban en el estadio de espermátida secundaria, es decir, la espermatogénesis ya estaba avanzada, lo que logró fue una espermiogénesis *in vitro*. Como resultado sorprendente, una única pareja, cuyo miembro masculino padecía de esta infertilidad, logró dar a luz a gemelos sanos de las cinco parejas estudiadas.

B. Maduración *in vitro* utilizando sistemas de cultivo con SSCs aisladas

Los sistemas de cultivo basados en suspensiones celulares (medios de cultivo con células testiculares previamente dispersadas mediante enzimas como la tripsina) pueden ser efectivas como sistemas de cultivo *in vitro* para la espermatogénesis completa de SSCs aisladas del tejido testicular. En la literatura estos se conocen como sistemas de cultivo de dos dimensiones (cultivos 2D).

Varios estudios trataron de definir sistema de cultivo 2D óptimo. Un sistema 2D adecuado dispondría de factores de crecimiento y hormonales que necesitan las SSCs para poder diferenciarse en células haploides maduras. También se investigó que clase de células alimentadoras o “feeder” serían las más adecuadas en estos medios.

Las células alimentadoras o “feeder” serán aquellas células comunes en el ambiente que rodea a las SSCs que se cultivarán en estos sistemas junto a ellas. Mediante factores de comunicación celular, favorecen el nicho celular necesario para promover el mantenimiento y diferenciación de las SSCs. En este caso se utilizaron células de Sertoli para dichos sistemas de cultivo.

Los medios de cultivo que darían mejores resultados tendrían que contener una combinación de células somáticas y células germinales tal y como lo estarían en el epitelio de los túbulos seminíferos. Así se conseguiría el mantenimiento de las SSCs, es decir, un equilibrio de divisiones mitóticas y meióticas. Para alcanzar este objetivo, estudios de 2004 comprobaron qué efecto tenían las hormonas, factores de crecimiento y células “feeder” en las espermátidas(17). Al usar un medio enriquecido con FBS, FSH, testosterona y células de Sertoli en co-cultivo como “feeder” se obtuvieron al segundo día de incubación espermátidas elongadas en un modelo de ratón, por lo que se constató que la presencia hormonal de FSH y testosterona, junto a las células de Sertoli, eran de gran importancia en la inducción de espermatogénesis *in vitro*, tanto en su fase inicial como en sus últimas etapas.

Algunos estudios propusieron una alternativa al medio suplementado con FBS con el llamado “Knockout Serum Replacement” o KSR para abreviar. Este es un suero para medios de cultivo que usen células “feeder”. Este medio está diseñado para uso en células

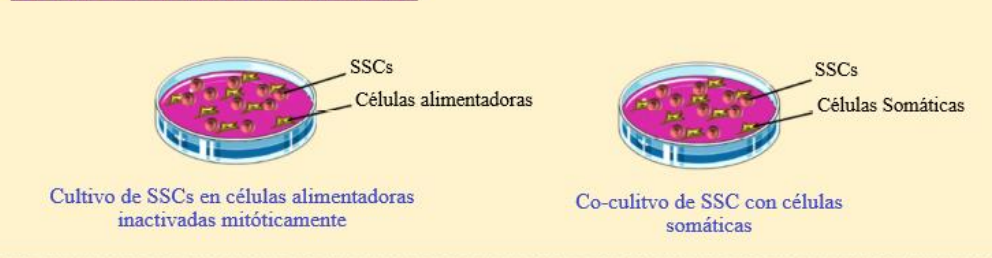
madre embrionarias, e incluso para células madre pluripotentes inducidas. A su vez, permite conservar su supervivencia y mantener su indiferenciación.

Los ensayos que probaron KSR en lugar de FBS mostraron resultados que indicaban que KSR promovía la diferenciación de las SSCs. Este fue el caso del ensayo de Ogawa, aunque destacamos que su equipo cultivó fragmentos de tejido testicular y no SSCs aisladas. El factor específico de KSR responsable de este efecto aún se desconoce (18). A su vez, un estudio trató de usar medio suplementado con FBS y durante 3 días cultivó las SSCs aisladas. Ocurridos estos días se le añadió ácido retinoico (AR), y tras dos días se comprobó el número de células haploides resultantes, la cual fue muy baja y no se comprobó su fertilidad (2).

Con el conocimiento generado gracias a los avances en los sistemas de cultivo organotípicos y en 2D, se comenzó a trabajar en un sistema que uniera ambos conceptos. Una manera de aportar el nicho celular de un cultivo organotípico utilizando tan solo las SSCs y células alimentadoras en una estructura tridimensional que simula los túbulos seminíferos en lugar del tejido completo. Así se propusieron los sistemas de cultivo en 3D. Los principales sistemas en 3D pueden ser: Aquellos que utilizan metilcelulosa (MCS), sistemas de agar blando (SACS en inglés) o los sistemas SCACS-stand (Figura 7).

En estos tres sistemas de cultivo en 3D, en cada caso, se observaron marcadores celulares de inicio de meiosis utilizando SSCs aisladas de ratones con 7 días de vida. Desafortunadamente, la capacidad de fecundación de las células haploides resultantes no fue comprobada (13).

Sistemas de cultivo Celular 2D



Sistemas de cultivo Celular 3D



Figura 7. Representación de los tipos de sistema de cultivo de suspensión celular 2D y 3D. Los sistemas en 2D cultivan las células en el mismo plano horizontal y pueden lograrse cultivando SSCs aisladas junto células alimentadoras inmortalizadas (su actividad mitótica se encuentra inactivada). Otra opción para los sistemas 2D consiste en utilizar células testiculares somáticas en lugar de las alimentadoras. Los principales sistemas de cultivo 3D comprenden los siguientes tipos: El sistema de cultivo de metilcelulosa (MCS), como su nombre indica añade un porcentaje de metilcelulosa que gelifica junto a las células cultivadas permitiendo que las propias se agreguen entre ellas aprovechando su capacidad de reorganización. El sistema de cultivo de agar blando (SACS) consiste en cultivar las SSCs en un gel de agar y justo debajo se cultivan las células somáticas en agar sólido. El sistema SACS-stand es similar al anterior, con la diferencia de que no posee células somáticas. Modificado de *Ibtisham F et al. Cells. 2020.*

Uno de los sistemas de cultivo en 3D que ha tenido mejores resultados son las estructuras tipo cordón. Este sistema rodea las SSCs con células de Sertoli “feeder” en un espacio que simula los túbulos seminíferos (Figura 8). Este sistema no solo provocó un aumento en la eficiencia respecto al mantenimiento de los sistemas 2D, sino que también se incrementó la fracción de células que iniciaban la diferenciación a células haploides hasta espermatidas alargadas en el estadio meiótico de paquiteno (18).

En otro ensayo diferente, el uso de un sistema 3D similar a MCS, cultivo células testiculares de rata suspendidos en Matrigel. Se colocó este Matrigel entre dos capas de Matrigel sin células. Después de 7 días se observó que las células comenzaron a formar organoides testiculares (13)

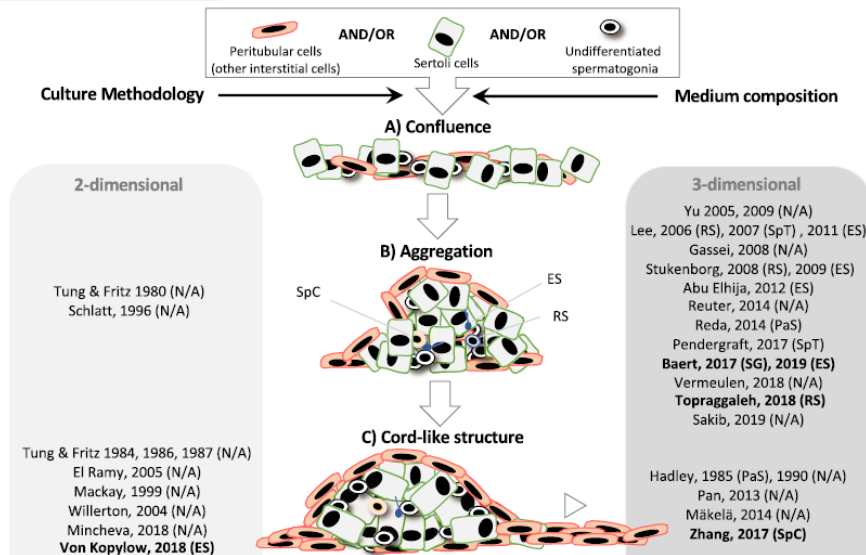


Figura 8. Representación de sistemas de cultivo en 2D (A y B) y 3D tipo cordón (C). Modificado de Richer G et al. *Andrology*. 2020.

Hubo un ensayo que trató de identificar la temperatura de cultivo más eficaz, que promoviera proliferación y diferenciación de las SSCs. Se cultivaron estas células a 39°C, 37°C y 32°C. En el primero las células SSC proliferaban, pero tras 6 meses, nunca llegaron a diferenciarse. En el segundo las células progresaban y un 28% se diferenciaban a células haploides, pero solo llegaban a los estadios más tempranos. En el tercero apenas hubo división mitótica y las células se centraban en diferenciarse (2).

En el caso de aquellos ensayos realizados con SSCs humanas, se ha comprobado que al co-cultivar estas células con fibroblastos como “feeder” se obtienen espermátidas redondas a los 5 días(3). No obstante, si utilizamos células de Sertoli con adición de testosterona y FSH, las células se diferencian hasta espermátidas tardías, ocurriendo de forma similar a lo observado en ratones. Aún no es posible comprobar la fertilidad de estos ensayos en humanos, ya que aquellos llevados a cabo en ratas en las mismas condiciones no dieron lugar a ningún tipo de descendencia.

Volviendo a ensayos humanos, al igual que en el caso del cultivo organotípico de tejido testicular de pacientes azoospermicos, se trató de cultivar SSCs aisladas de biopsias de pacientes azoospermicos de cariotipo normal (19). Se utilizó un medio enriquecido con FSH y testosterona, utilizando células de Sertoli como células alimentadoras. Tras dos semanas se consiguió que se diferenciaron en espermátidas de estadios tardíos.

Desafortunadamente, al comprobar su capacidad de fecundación mediante ICSI y ROSI se dio lugar a embriones en las que menos de la mitad llegó a blastocistos y todos poseían anomalías a en sus cromosomas sexuales y no fueron transferidos.

Por el momento no se ha logrado replicar la espermatogénesis completa *in vitro* que produzca espermátidas capaces de realizar la fecundación y provengan de tejido humano. Tampoco se ha logrado en primates no humanos (7).

7. Discusión

En este trabajo tratamos de comprender si la espermatogénesis *in vitro* es una técnica de la restauración de la fertilidad orientado a pacientes azoospermicos, especialmente aquellos que han pasado por quimio o radioterapia con efectos gonadotóxicos.

La espermatogénesis es uno de los procesos más complejos de desarrollo celular que nuestro cuerpo lleva a cabo, por tanto, continúa siendo un proceso difícil de replicar en el laboratorio ya sea utilizando SSC de manera aislada o fragmentos de tejido testicular.

Estas técnicas, aún en fase experimental, continúan siendo, en ciertas circunstancias, la única opción para que estos pacientes puedan tener descendencia biológica (3).

a. Eficiencia de la técnica

En ratones, se ha demostrado que la espermatogénesis *in vitro* es posible, y gracias a ella es posible obtener descendencia. Desafortunadamente, la eficiencia es muy baja (un porcentaje elevado de estos espermatoцитos son genéticamente aberrantes) comparado con aquellos espermatozoides obtenidos de ratones adultos sanos (11). También se ha demostrado que la criopreservación no afecta a la eficiencia de estas técnicas, al demostrar que se obtienen los mismos resultados en los ensayos que lo han comparado (12)

La espermatogénesis es un proceso altamente complejo para el organismo y existen diversas razones que explican por qué la gran mayoría de los espermatoцитos obtenidos en estas técnicas son genéticamente aberrantes. Una de las más importantes radica en el hecho de que en la espermatogénesis *in vivo*, los espermatoцитos que no superan los varios “checkpoints” de ciclo meiótico (por ejemplo, si poseen una aneuploidía) entran en apoptosis y evitan su propagación a un posible embrión. Actualmente la teoría más plausible sobre este problema es que los “checkpoints” del ciclo meiótico no actúan con la misma eficiencia *in vitro*, de la manera que lo hacen *in vivo*. Por tanto, la mayoría de los espermatoцитos que se usan para ICSI o ROSI acaban en fracaso (7).

Una posible explicación de por qué estos “checkpoints” no actúan con la misma eficiencia es, aunque se ha avanzado en la conservación de fragmentos de tejido testicular en sistemas de cultivo organotípicos, que no se ha conseguido replicar del todo el microambiente necesario que necesitan estas células para completar su diferenciación. Se necesita más investigación sobre estos eventos meióticos clave, para así aumentar la

eficiencia de la técnica y asegurarnos que la descendencia de estos pacientes se encuentre libre de estas anomalías.

b. Sistemas de cultivo

Como hemos ido detallando, a lo largo de la historia se han logrado grandes avances sobre el correcto uso de los mejores sistemas de cultivo en estas técnicas.

Respecto a los medios de cultivo organotípicos podemos decir que aportan los resultados más alentadores. A pesar de estos resultados, la eficiencia de estos medios de cultivo de órganos sigue siendo considerablemente baja a la hora de inducir la espermatogénesis y el mantenimiento de los fragmentos de tejido a largo plazo aun no superan los 6 meses, por lo que aún quedan muchos obstáculos que superar para llegar al ensayo clínico. El desarrollo de sistemas de microfluidos podría ser la solución para alcanzar el objetivo de poder mantener estos tejidos por largos periodos de tiempo.

Hemos comentado que los sistemas de cultivos en 2D pueden resultar de gran utilidad para expandir las SSCs, ya que los componentes del medio de cultivo usado difunden libremente para uso de las SSCs. Esto permite monitorizar la expresión genética de las células según se añaden diferentes factores, los cuáles promueven la diferenciación y/o mantenimiento de la línea celular. Esto facilita un control más directo del ambiente celular y mejor difusión de los componentes que el que permiten los sistemas de cultivo para fragmentos organotípicos cuyo mantenimiento de las SSCs es más dificultoso ya que su estructura nos impide este acceso directo.

Sin embargo, comparado con los sistemas organotípicos, los cultivos 2D son incapaces de representar el nicho testicular en las que se encuentran realmente las SSCs. Las conexiones intracelulares y condiciones estructurales de las que estos sistemas carecen podrían explicar por qué la mayoría de los ensayos acaban es espermatoцитos morfológicamente anormales y con errores en su (epi)genoma. Actualmente no existen ensayos que aborden el efecto del epigenoma que tienen estos sistemas medios de cultivo en células humanas.

Los sistemas de cultivo en 3D son más eficientes a la hora de mantener e inducir la diferenciación de las SSCs aisladas, puesto que simula las interacciones celulares y aquellas condiciones estructurales que presentarían los túbulos seminíferos. Por otro lado, también ofrece la capacidad de que las células utilicen su capacidad de reorganización

espacial y adopten su típica morfología celular, e incluso puedan formar organoides testiculares. Estas características permiten un sistema fisiológico estable que permite el correcto mantenimiento y diferenciación de SSCs aisladas, por lo que es posible que en el futuro este tipo de sistemas sean los más adecuados para la espermatogénesis *in vitro* aplicada a pacientes. Sin embargo, los ensayos actuales se encuentran en estadios muy prematuros.

c. Aplicabilidad en humanos

Por el momento, aún no se ha logrado replicar la espermatogénesis completa de células germinales humanas ni en primates no humanos. Tampoco se ha logrado mantener SSCs vivas durante más de 11 días, por lo que aún estamos muy lejos de los ensayos clínicos.

Solo en un ensayo se ha demostrado que en casos de pacientes azoospermicos, es posible madurar biopsias testiculares cuando estén detenidas en estadios avanzados de la espermatogénesis. De esta forma madurar *ex vivo* estas células germinales y posteriormente mediante ICSI y/o ROSI fecundar ovocitos, resultando en embriones sanos que acaban en partos que llegan a término. No obstante, esto presenta el inconveniente de que la espermatogénesis ya debe estar iniciada *in vivo* para que esta técnica funcione, pues el ensayo solo logra la espermiogénesis *in vitro*. De manera que es posible que la razón de su éxito sea que la mayor parte del proceso se realizó *in vivo* (16).

A pesar de todo, en humanos, la espermiogénesis dura aproximadamente 20 días. Resulta sorprendente e inesperado que espermiogénesis *in vitro* de dicho ensayo se logrará en 24 horas. Esta puede ser la razón de por qué la mayoría de las espermátidas fueron morfológicamente aberrantes. Los resultados de este ensayo muestran el comportamiento de las SSCs humanas no se encuentra suficientemente investigado. Añadimos que no se ha logrado repetir estos resultados en ensayos más recientes (16).

Es muy pronto para juzgar la utilidad de la técnica y su aplicabilidad en los casos de infertilidad masculina que nos concierne. Sin embargo, los resultados en modelos animales demuestran que este proceso es posible y que hay esperanza para estos pacientes de llegar al objetivo de una restauración completa de la fertilidad. Entonces la situación se convertiría en una revolución del tratamiento de la infertilidad masculina.

d. Aproximaciones futuras

La espermatogénesis *in vitro* no solo tendría el potencial de restaurar la fertilidad de pacientes azoospermicos y preservar la fertilidad de niños oncológicos, sino que puede

combinarse con varias de las innovadoras terapias experimentales que se encuentran en desarrollo en la actualidad.

Si el paciente tiene algún tipo de azoospermia secretora relacionada con un defecto genético (ya sea por una mutación o defecto cromosómico) podrían ser los pacientes ideales para reparar su defecto genético mediante técnicas de terapia génica. En teoría, esto sería posible si en el futuro surgieran herramientas de edición génica seguras para uso en humanos. Por ejemplo, si el error se presentara en un gen “X” mutante, podríamos tratar infectar las SSCs recuperadas del paciente mediante un vector viral que posea el gen “X” sano. Mediante el mecanismo de recombinación genética, el gen sano se impondría sobre el mutante y tras una selección obtendríamos SSCs con el gen sano. Después, se podrían expandir estas SSCs reparadas y posteriormente diferenciarlas en espermatoцитos maduros para usarlas en ICSI o ROSI brindando la oportunidad de paternidad a estos pacientes (3).

A su vez, la producción *in vitro* de células germinales a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPS) o aquellas células madre embrionarias (ES) también abren la posibilidad de restaurar la fertilidad de pacientes varones que no disponen de SSC en sus testículos o que han pasado por terapia gonadotóxica y no crioconservaron ninguna muestra a tiempo. Las iPS se diferenciarán *in vitro* hacia SSC y según el caso pueden ser trasplantadas en el testículo o diferenciarse directamente a espermatoцитos (Figura 9).

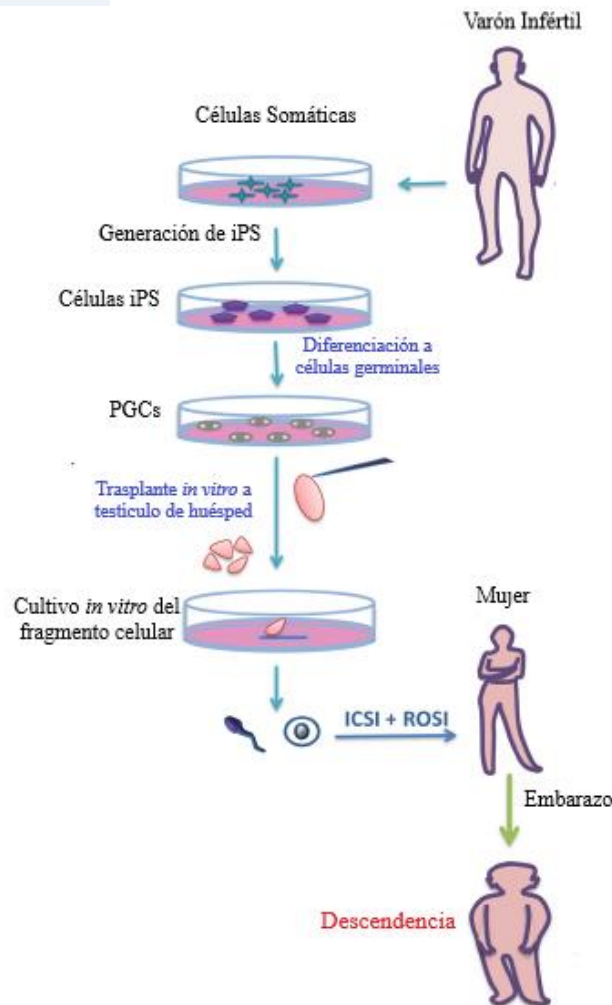


Figura 9. Aplicación de la maduración in vitro en pacientes infértiles azoospermicos no obstructivos. Modificado de Ibtisham F et al. *Oncotarget*. 2017

Es más, el equipo liderado por Ogawa consiguió obtener SSCs a partir de ES de ratón. Las SSCs se diferenciaron a través de la meiosis y produjeron gametos in vitro. Estas células haploides se utilizaron en ICSI que dio lugar a descendencia. La eficiencia en la producción de esta descendencia fue baja y las crías de ratón murieron de manera prematura (3). No obstante, valdría el esfuerzo seguir estudiando esta técnica puesto que podría ser la clave para curar cualquier tipo de azoospermia secretora que el paciente varón pueda presentar.

8. Conclusiones

1. Aún queda mucha investigación por realizar antes de que pueda alcanzarse la completa espermatogénesis *in vitro* en células humanas.
2. Los sistemas de cultivo organotípicos presentan actualmente resultados más alentadores que aquellos sistemas de cultivo células aisladas, debido a la ausencia del nicho celular que precisan estas células madre para su diferenciación.
3. El FBS tiene la capacidad de inducir la diferenciación de las SSCs en sus etapas iniciales.
4. En los sistemas de cultivo la presencia de FSH, testosterona y células de Sertoli “feeder” son importantes factores para una correcta espermatogénesis *in vitro*.
5. Los sistemas de cultivo en 3D tienen el potencial de reunir las características necesarias para simular el nicho testicular completo de las SSCs, sin embargo, los actuales estudios son aún muy prematuros.
6. Existen grandes lagunas en el conocimiento sobre los eventos meióticos más importantes de la espermatogénesis y el impacto epigenético de las condiciones de cultivo *in vitro*, por lo que investigación en modelos animales en este campo es necesaria antes de pasar a los ensayos clínicos humanos.

9. Bibliografía

1. Parekattil SJ, Agarwal A. Male infertility: Contemporary clinical approaches, andrology, art & antioxidants. *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART and Antioxidants*. 2012 Jan 1;1–518.
2. Galdon G, Atala A, Sadri-Ardekani H. In Vitro Spermatogenesis: How Far from Clinical Application? *Curr Urol Rep* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2022 Jun 2];17(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27107595/>
3. Ibtisham F, Wu J, Xiao M, An L, Banker Z, Nawab A, et al. Progress and future prospect of in vitro spermatogenesis. *Oncotarget*. 2017;8(39):66709–27.
4. Bîcă O, Sârbu I, Ciongradi CI. Pediatric and Adolescent Oncofertility in Male Patients-From Alpha to Omega. *Genes (Basel)* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 May 16];12(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34066795/>
5. Fujita K, Tsujimura A. Fertility preservation for boys with cancer. *Reprod Med Biol* [Internet]. 2010 [cited 2022 Jul 5];9(4):179. Available from: </pmc/articles/PMC5904621/>
6. Molina MT. *Revista Pediatría de Atención Primaria Volumen XI*. 2009;16.
7. Sanou I, van Maaren J, Eliveld J, Lei Q, Meißner A, de Melker AA, et al. Spermatogonial Stem Cell-Based Therapies: Taking Preclinical Research to the Next Level. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2022 Apr 4 [cited 2022 May 16];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444616/>
8. Diao L, Turek PJ, John CM, Fang F, Reijo Pera RA. Roles of Spermatogonial Stem Cells in Spermatogenesis and Fertility Restoration. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2022 May 12 [cited 2022 Jul 5];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35634498/>
9. Deebel NA, Galdon G, Zarandi NP, Stogner-Underwood K, Howards S, Lovato J, et al. Age-related presence of spermatogonia in patients with Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Jul 7];26(1):58–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31822886/>
10. Mahmoud H. Concise review: Spermatogenesis in an artificial three-dimensional system. *Stem Cells* [Internet]. 2012 Nov [cited 2022 Jul 7];30(11):2355–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22997006/>
11. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011 471:7339 [Internet]. 2011 Mar 23 [cited 2022 Jul 7];471(7339):504–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature09850>
12. Martin-Inaraja M, Eguizabal C. Challenges of Stem Cell Therapies for the Treatment of Infertility in Reproductive Medicine. In: Turksen K, editor. *Stem Cells in Reproductive Tissues and Organs From Fertility to Cancer*. 1st ed. Canada: Humana Press; 2022. p. 155–78.

13. Ibtisham F, Honaramooz A. Spermatogonial Stem Cells for In Vitro Spermatogenesis and In Vivo Restoration of Fertility. *Cells* [Internet]. 2020 Mar 18 [cited 2022 Jul 14];9(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32197440/>
14. Sato T, Katagiri K, Kojima K, Komeya M, Yao M, Ogawa T. In Vitro Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jun 12 [cited 2022 Aug 7];10(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26065832/>
15. Matte R, Sasaki M, Matte R. Autoradiographic evidence of human male germ-cell differentiation in vitro. *Cytologia (Tokyo)* [Internet]. 1971 [cited 2022 Aug 31];36(2):298–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5566380/>
16. Tesarik J, Greco E, Rienzi L, Ubaldi F, Guido M, Cohen-Bacrie P, et al. Differentiation of spermatogenic cells during in-vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia: effect of recombinant follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* [Internet]. 1998 [cited 2022 Jul 13];13(10):2772–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9804229/>
17. Movahedin M, Ajeen A, Ghorbanzadeh N, Tiraihi T, Valojerdi MR, Kazemnejad A. In vitro maturation of fresh and frozen-thawed mouse round spermatids. *Andrologia* [Internet]. 2004 Oct [cited 2022 Jul 8];36(5):269–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15458544/>
18. Richer G, Baert Y, Goossens E. In-vitro spermatogenesis through testis modelling: Toward the generation of testicular organoids. *Andrology* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Jul 15];8(4):879. Available from: [/pmc/articles/PMC7496450/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33444444/)
19. Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Barros A. Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. *Hum Reprod* [Internet]. 2002 [cited 2022 Jul 13];17(1):161–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11756382/>