

Andrología

## **Uso de células espermáticas inmaduras en el tratamiento de la infertilidad masculina: maduración in vitro de células germinales masculinas**

*Use of immature spermatogenic cells in male infertility treatment: in-vitro maturation of male germ cells*

Rausell F, Gómez-Piquer V, Tarín JJ

Departamento de Biología Funcional y Antropología Física, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València, Burjassot, 46100 Valencia

### **Resumen**

**Objetivos:** Realizar una puesta al día de los resultados de la inyección intracitoplasmática de células espermáticas inmaduras, así como de los distintos métodos que existen en la actualidad para madurar in vitro dichas células en el tratamiento de la infertilidad masculina debida a azoospermia no obstructiva.

**Métodos:** Revisión de la literatura.

**Resultados:** En humanos, se ha logrado obtener descendencia sana y normal a partir de la inyección de espermátidas elongadas, en elongación y redondas, así como de espermatoцитos secundarios. Sin embargo, todavía no se ha conseguido obtener descendencia a partir de espermatoцитos primarios. Los porcentajes de fecundación como de embarazo a término tras inyección intracitoplasmática de células espermáticas inmaduras son menores que los obtenidos con espermatozoides maduros. Los resultados dependen de la patología que causa la azoospermia no obstructiva y del tipo de célula espermática utilizada, siendo mejores cuantos más focos de espermatogénesis queden activos y cuanto más madura sea la célula espermática. El cultivo de células espermáticas puede ayudar a superar el bloqueo espermatogénico en pacientes con azoospermia no obstructiva. Para mejorar la maduración in vitro de células espermáticas, se han utilizado hormonas, tales como la testosterona o la FSH; cocultivos con células de Sertoli o células Vero; líquidos corporales, incluyendo el fluido de la red testicular de cerdo, el fluido sintético de oviducto humano, etc; factores de crecimiento, tales como el factor-1 parecido a la insulina o el factor- $\alpha$  de crecimiento transformante; u otras sustancias, incluyendo el retinol, estradiol, etc. Se ha obtenido descendencia sana y normal tras conseguir madurar in vitro hasta la fase de espermátidas elongadas, espermatoцитos primarios y espermátidas redondas, en pacientes que sufrían bloqueo de la espermatogénesis y fallo completo de la espermiogénesis, respectivamente.

---

**Correspondencia:** Dr. Juan J. Tarín  
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Valencia  
Avda. Blasco Ibañez 17  
46010 Valencia;  
e-mail: tarinjj@uv.es

Conclusiones: *El cultivo in vitro de células espermáticas inmaduras junto con la utilización de células espermáticas obtenidas in vivo parecen ser dos opciones válidas en el tratamiento de la azoospermia no obstructiva, a pesar de los riesgos genéticos inherentes que deben ser investigados con mayor profundidad.*

**Palabras clave:** Azoospermia no-obstructiva. Células germinales inmaduras. ICSI. Infertilidad masculina. Maduración in vitro.

### **Summary**

Objectives: *To analyze the state of the art of the results obtained after intracytoplasmic injection of immature sperm cells as well as the different methods used nowadays to mature these cells for the treatment of male infertility due to non-obstructive azoospermia.*

Methods: *A literature review.*

Results: *In humans, the injection of elongated, in elongation and round spermatids as well as secondary spermatocytes into oocytes has produced healthy and normal offspring. However, human offspring has not yet been obtained after injection of primary spermatocytes. Fertilization and full-term pregnancy percentages after intracytoplasmic injection of immature spermatogenic cells are lower than those obtained after injection of mature spermatozoa. Results depend on the pathology that causes non-obstructive azoospermia, as well as on the type of spermatogenic cell used. In fact, the more active spermatogenesis foci are present in the testes, and the more mature is the spermatogenic cell used, the best results are achieved. Spermatogenic cells culture can overcome the spermatogenic block in patients suffering from non-obstructive azoospermia. For improving the results of in vitro maturation of spermatogenic cells, hormones, such as rFSH and testosterone; co-culture with Sertoli and Vero cells; body fluids, such as boar rete testis fluid or human synthetic oviduct fluid; growth factors, including insulin like growth factor-1 or transforming growth factor- $\alpha$  or other substances such as estradiol, retinol, etc. have been used. Healthy and normal offspring have been obtained after injection of elongated spermatids obtained after in vitro maturation of primary spermatocytes and round spermatids from men suffering from spermatogenesis arrest and complete spermiogenesis failure, respectively.*

Conclusions: *In vitro maturation of immature sperm cells together with the use of spermatogenic cells obtained in vivo appear to be two valid options for the treatment of non-obstructive azoospermia. Nevertheless, the inherent genetic risks should be investigated more deeply.*

**Key words:** ICSI. Immature sperm cells. In vitro maturation. Male infertility. Non-obstructive azoospermia.

## **INTRODUCCIÓN**

Las técnicas de reproducción asistida permiten tener descendencia propia a aquellos hombres que sufren de distintas patologías, las cuales impiden que sus gametos masculinos puedan alcanzar la fecundación de los óvulos de sus respectivas parejas. El efecto de algunas de estas patologías provoca la aparición de azoospermia, es decir, la ausencia total de espermatozoides en el eyaculado. Esta azoospermia puede ser obstructiva o no obstructiva. Los casos más graves y complejos suelen aparecer en pacientes con azoospermia no obstructiva, ya que en el caso de que la azoospermia sea obstructiva se pueden recuperar espermatozoides del testículo para inyección intracitoplasmática (ICSI).

La azoospermia no obstructiva puede estar causada por problemas más difíciles de resolver (1). Entre ellos, podemos mencionar una disfunción primaria (anormalidades cromosómicas, trauma, varicocele, criptorquidia, etc.) o una disfunción endocrina (defectos en el eje hipotálamo-pituitaria-testículo) y exocrina secundaria de los testículos (enfermedades orgánicas o sistémicas como fallo renal crónico, insuficiencia hepática, etc.). Tales disfunciones provocan un incorrecto desarrollo de la espermatogénesis y, por tanto, una ausencia de espermatozoides maduros tanto en el eyaculado como en el testículo.

En el caso que la espermatogénesis se detenga a nivel de las espermátidas redondas, la inyección intracitoplasmática de dichas espermátidas (ROSI) o de

sus núcleos (ROSNI) es la única solución para pacientes con azoospermia no obstructiva (1, 2). Sin embargo, una de las principales dificultades de la aplicación de estas técnicas es el reconocimiento e identificación de las espermátidas redondas vivas, intactas y viables (1, 3-5). La utilización de microscopía confocal o de microscopios invertidos junto asistidos por ordenador pueden ayudar a dicha identificación, aunque no están al alcance de todos los laboratorios de reproducción asistida. Una posible solución a los problemas de reconocimiento e identificación de espermátidas redondas viables sería la selección de espermátidas potencialmente fértiles y su posterior modificación o tratamiento in-vitro, pudiendo obtener, de este modo, células germinales más maduras o permitir que dichas células recuperen su potencial de desarrollo (3) (ver más abajo).

Las espermátidas deben recogerse a ser posible en el eyaculado, evitando, en la medida de lo posible, la biopsia testicular para no poner en peligro los pocos focos con espermatogénesis completa que puedan quedar en los testículos de los pacientes (2). En el caso de recurrir a la biopsia, es más adecuada la biopsia testicular terapéutica que la biopsia testicular diagnóstica, para la búsqueda de células germinales, ya que en el primer caso se consigue aislar las células en un medio de cultivo que les permite vivir, evitando de este modo su degradación y facilitando, por tanto, su posterior identificación, mientras que, en el segundo caso, el tejido testicular es sometido a detergentes durante la fijación y tinción que pueden hacer perder la identidad de determinadas células (1).

Este estudio tiene como objetivo realizar una puesta al día de los resultados de la inyección intracitoplasmática de células espermáticas inmaduras, así como de los distintos métodos que existen en la actualidad para madurar in vitro dichas células en el tratamiento de la infertilidad masculina debida a azoospermia no obstructiva.

### **UTILIZACIÓN DE CÉLULAS GERMINALES PREVIAS AL ESPERMATOZOIDE MADURO OBTENIDAS IN VIVO**

Son varios los animales en los que se ha experimentado el uso de espermátidas para lograr la obtención de descendencia. Hace ya tiempo que se consiguió obtener descendencia a partir de dichas células en animales como el conejo (6, 7) o el ratón (8, 9), demostrando, por tanto, la validez de las espermátidas redondas para llevar a cabo el proceso de fecundación y posterior desarrollo embrionario.

Si se compara en el ratón el uso de espermatozoides testiculares frente a ROSNI se logran porcentajes de fecundación del 94% frente a un 77% e índices de descendencia obtenida del 54,5% frente a un 28,2%, respectivamente, aunque estas diferencias podrían deberse más a problemas técnicos que a la célula utilizada para la inyección (10).

Se ha conseguido obtener descendencia a partir de las espermátidas redondas de ratones sanos, así como de un ratón azoospermico que no presentaba espermatozoides maduros en el epidídimo ni en el testículo (8, 9). Asimismo, se sabe que la microinyección de espermátidas redondas en ovocitos de ratón produce mayores porcentajes de fecundación que la técnica de electrofusión con el ovocito (64% frente al 26%, respectivamente), así como mayores proporciones de fetos desarrollados (13,6% frente al 8,8%, respectivamente) (9). En la tabla 1, se pueden observar los distintos resultados obtenidos en la fecundación con diferentes tipos de células germinales masculinas, en el ratón y en humano, mostrando una gran variabilidad entre laboratorios.

En el ratón, la inyección de espermátidas es más eficaz si se acompaña de la inyección conjunta de  $Ca^{2+}$  o de un factor espermático, ya que en este último caso el porcentaje de fecundación pasa de un 7% si se inyecta una espermátida sola a un 75%; el porcentaje de activación de un 50% a un 92%; y el desarrollo embrionario hasta la fase de blastocisto de un 0% a un 48%. Asimismo, permite obtener un 22% de descendencia viva tras transferencia de embriones de 2 células en madres adoptivas (11). También, en el conejo, la proporción de ovocitos activados es significativamente superior cuando se combina la estimulación mecánica y eléctrica en comparación con la utilización de sólo una estimulación mecánica, mejorando también el desarrollo embrionario, en general, y el número de descendientes obtenidos (7).

La inyección de espermátidas redondas en ovocitos humanos estimula el desarrollo de oscilaciones de  $Ca^{2+}$  en los ovocitos, de forma similar a la estimulación realizada por espermatozoides maduros. Por tanto, las espermátidas redondas humanas contienen suficiente factor espermático soluble para sensibilizar el mecanismo de oscilación de  $Ca^{2+}$  de los ovocitos. Posteriormente a esta sensibilización, hace falta la actuación de un ionóforo de  $Ca^{2+}$  para inducir la aparición de dichas oscilaciones. Los espermatozoides I y II son incapaces de producir oscilaciones de  $Ca^{2+}$ , por lo que en humanos parece ser que el factor espermático soluble desarrolla su actividad entre la fase de espermatozoides I y espermátida redonda (12).

**Tabla 1**

Porcentajes de fecundación obtenidos por diferentes autores al inyectar diferentes células de la línea germinal masculina en ovocitos de ratón y humanos

Célula espermática	Especie	% Cigotos con 2 pronúcleos	Referencias
Espermatozoides	Ratón	94 (n=191) 47 (n=317)	Kimura & Yanagimachi (1995) Ziyyat & Lefèvre (2001)
	Humanos	79 (n=19)	Fishel et al. (1997)
Espermátidas elongadas	Humanos	38 (n=26) 36 (n=137)	Fishel et al. (1997) Barak et al. (1998)
		Humanos	66 (n=79)
Espermátidas redondas	Ratón	30 (n=15) 77 (n=46) 83 (n=92) 45 (n=698)	Ogura et al., 1994 Kimura & Yanagimachi (1995) Sasagawa et al. (1998) Ziyyat & Lefèvre (2001)
	Humanos	24 (n=19) 27 (n=37) 47 (n=570)	Fishel et al. (1997) Barak et al. (1998) Silber et al. (1996)
Espermatocitos II	Ratón	75 (n=138)	Kimura & Yanagimachi (1995)
Espermatocitos I	Ratón	84 (n=1009)	Kimura et al. (1998)
	Ratón	87 (n=173)	Sasagawa et al. (1998)

Ogura et al. (1) reconocen las siguientes diferencias entre ROSI/ROSNI: ROSI ofrece la ventaja que se transfieren todos los componentes citoplasmáticos al ovocito, se consume menos tiempo y se evita la manipulación del núcleo y de sus alrededores. Ahora bien, esto también significa que se necesitan micropipetas de mayor tamaño y se aumentan las posibilidades de dañar al ovocito durante la inyección. Además, el citoplasma que envuelve al núcleo puede impedir su transformación pronuclear. La activación del ovocito humano es un requisito necesario para el desarrollo del pronúcleo masculino y posterior fecundación, la sustancia de activación del ovocito presente en el espermatozoide, también en las espermátidas redondas en humanos, se sospecha que está situada en las proximidades del núcleo del espermatozoide o espermátida, por tanto en ROSNI el contacto de esta sustancia con el citoplasma del ovocito será mayor que en ROSI, donde dicha sustancia está aislada del ovocito por la membrana celular y una mayor cantidad de citoplasma. En consecuencia, la activación del ovocito será más rápida en ROSNI que en ROSI.

Los problemas con ROSI aparecen también en una transición incompleta de histonas a protaminas. Las

protaminas sustituyen a las histonas durante la espermatogénesis y se encargan de compactar el núcleo del espermatozoide, evitar la degradación del DNA durante el tránsito genital y protegerlo frente a un estrés desnaturante del DNA que podría inducir apoptosis en las espermátidas. Además, evitan que el factor promotor de la metafase (MPF) presente en el ovocito pueda inducir un bloqueo del ciclo celular en el estadio de metafase. La solución a este problema pasa por activar el ovocito antes o durante la inyección de la espermátida (3), ya que la activación del ovocito se asocia con una inactivación del MPF presente en el ovocito. Dicha activación se puede conseguir mediante aspiración ovoplásmica profunda durante la inyección, pulsos eléctricos, incubación con ionóforos de  $Ca^{2+}$  o inyección de oscilina.

Los bajos porcentajes de implantación y embarazo obtenidos después de ROSI/ROSNI, a pesar de que los porcentajes de fecundación son relativamente altos, pueden deberse a que los factores de las espermátidas que influyen en el desarrollo embrionario no han madurado lo suficiente para realizar su función adecuadamente. Por ejemplo, es importante conocer si, en las espermátidas redondas humanas, la impron-

ta genética, es decir, la modificación específica de los alelos del DNA que permite una expresión diferente de los alelos maternos y paternos de determinados genes (13), es la adecuada, ya que ésta puede verse alterada por el uso de gametos inmaduros o madurados en condiciones inusuales (cultivo in vitro, por ejemplo). En el trabajo de Ziyyat y Lefèvre (14), se confirma que, en el ratón, después de la fecundación con espermátidas redondas, se activan mecanismos reguladores que inhiben la transcripción errónea de genes paternos expresados después de la meiosis. La inhibición depende de cada gen en concreto. Además, hay que tener en cuenta que (14) utilizaron espermátidas redondas procedentes de machos sanos, las cuales pueden comportarse de modo diferente a las espermátidas procedentes de hombres infértiles. Sin embargo, se ha observado que la capacidad de fecundación y de desarrollo embrionario de las espermátidas redondas de ratones híbridos estériles vs. ratones fértiles no difiere significativamente, obteniéndose descendencia en ambos casos (15).

En humanos, también se ha conseguido el nacimiento de niños sanos y normales gracias al uso de espermátidas redondas (4, 13, 16, 17). Asimismo, se reconoce que la inyección de espermátidas redondas ofrece unos resultados peores que la inyección de espermátidas en elongación o elongadas, y la inyección de espermatozoides testiculares (3-5, 13, 16, 18). En concreto, se obtienen peores porcentajes de fecundación (26%-45% con espermátidas redondas vs. 67-71% con espermátidas elongadas y espermatozoides) y un descenso claro del potencial de desarrollo hasta el estadio de blastocisto (8.5-25.5% vs. 46-53.3%, respectivamente) e implantación (5,5% vs. 10,5%). Los resultados varían dependiendo de: (1) la severidad patológica, ya que cuando la espermatogénesis es completa en >20% de los túbulos seminíferos, los porcentajes de fecundación son mayores que cuando la espermatogénesis es incompleta (azoospermia no obstructiva). Vanderzwalmen et al. (16) sugieren la posibilidad de que, en este último caso, las espermátidas pueden sufrir algún daño genético. (2) Tipo de célula inyectada. De hecho, tal como hemos mencionado anteriormente, se obtienen mejores resultados con espermátidas elongadas que con espermátidas redondas. Sofikitis et al. (19) alcanzaron una activación ovocitaria del 86% al usar espermátidas en elongación, lo cual demostró que el factor de activación del ovocito en humanos aparece durante o antes de los primeros pasos de la espermiogénesis. Ziyyat y Lefèvre (14), sin embargo, lograron porcentajes de fecundación similares tras ICSI de espermatozoides e inyección de espermátidas, aunque en este caso po-

dría deberse a que estos autores consiguieron alcanzar un mejor reconocimiento de las espermátidas, utilizando técnicas de citometría de flujo. Estas técnicas les permitió escoger las espermátidas más maduras y justo antes de elongarse.

Kimura y Yanagimachi (4) lograron un porcentaje de embarazo en humanos del 13% tras inyección de espermátidas redondas. Sin embargo, Araki et al. (20) habían logrado previamente un porcentaje de embarazo del 33,3%, utilizando espermátidas maduras.

Los trabajos arriba citados demuestran que el núcleo de las espermátidas redondas puede ser adecuado para el correcto desarrollo del embrión y aportar los genes paternos necesarios para ello, aunque Balaban et al. (5) muestran la poca capacidad de los embriones procedentes de ROSI de alcanzar avanzados estadios de desarrollo embrionario.

Con espermatoцитos II, se han logrado en el ratón porcentajes de fecundación del 75% y nacimiento de descendencia viva de un 24% de los embriones de dos células transferidos a madres adoptivas. Estos individuos se desarrollaron normalmente hasta la fase adulta y resultaron ser fértiles, al igual que su descendencia (21). En humanos, se ha conseguido obtener un embarazo a término con la misma técnica en una pareja en la que el hombre padecía de bloqueo espermatogénico a nivel de los espermatoцитos secundarios (22).

Se ha conseguido también fecundar ovocitos de ratón con espermatoцитos primarios (23, 24). Este hecho demuestra que la impronta genética en el ratón se alcanza antes de terminar la primera división meiótica. En concreto, hasta el momento, parece ser que los espermatoцитos en paquitene/diplotene son las células germinales más "jóvenes" que pueden ser utilizadas para obtener embriones diploides normales, ya que los factores que llevan a cabo la condensación de los cromosomas, organización de las metafases y separación de los cromosomas durante la anafase de los ovocitos pueden inducir los mismos procesos en los núcleos de los espermatoцитos primarios inyectados en ellos (25). Esta técnica parece dar mejores resultados si los espermatoцитos se inyectan en ovocitos en metafase I, aunque las tasas de nacimiento son bajas todavía (4%), comparadas con las obtenidas con el uso de espermátidas (10-30%) (23). Esta técnica podría ser la última oportunidad para aquellos hombres con azoospermia no obstructiva que presentan una detención de la espermatogénesis a nivel de los espermatoцитos primarios. Sin embargo, se necesita todavía mejorar las técnicas de cultivo in vitro de células germinales masculinas, puesto que se observa una gran incidencia de anomalías cromosómicas durante las divisiones meióticas in vitro (23).

## CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS GERMINALES MASCULINAS INMADURAS

El cultivo in vitro de células germinales masculinas puede ayudar a modificar genéticamente dichas células, estudiar el proceso espermatogénico in vivo, estudiando posibles mecanismos de regulación, enzimas participantes, etc., y solucionar algunos problemas severos de infertilidad masculina, particularmente, aquellos producidos por azoospermia no obstructiva, ya que el cultivo in vitro podría superar el bloqueo de la meiosis que existe in vivo. Este apartado se centrará en este último aspecto.

Hace tiempo que se consiguió demostrar que distintos estadios de células espermáticas podían sobrevivir y diferenciarse in vitro, así como que los espermatoцитos primarios eran capaces de completar las dos divisiones meióticas en condiciones de cultivo para dar lugar a espermátidas redondas (26). Sin embargo dichas espermátidas no eran capaces de completar la espermiogénesis con éxito. Cabe destacar que en ese estudio (26), se cultivaron fragmentos de conductos seminíferos de rata, en diferentes estadios de la espermatogénesis, sin la adición de ninguna hormona, utilizándose la citometría de flujo de DNA como método de cuantificación de la diferenciación in vitro de células espermáticas. El estudio mostró que, tras 6 días de cultivo, la proporción de espermátidas redondas/espermatoцитos en paquitene (2:1) era menor que la encontrada en muestras aisladas en fresco (4:1). Es decir, el proceso de maduración in vitro resultó ser menos eficaz que la maduración in vivo.

Más recientemente (27), se ha demostrado que la meiosis puede reiniciarse in vitro, alcanzándose un porcentaje del 5-7%, al menos, con muestras con espermatoцитos en paquitene tardío o espermatoцитos secundarios. Además, a partir de espermátidas redondas pueden obtenerse espermátidas tardías normales con porcentajes que varían entre el 12-32%, resultados obtenidos tras 2-3 semanas de cultivo de espermatogonias y espermatoцитos con células de Sertoli en pacientes con azoospermia no obstructiva. Sin embargo, si la detención de la meiosis es completa, los porcentajes se reducen a un 3,3% y un 5% respectivamente.

Desde los primeros intentos de llevar a cabo la espermatogénesis in vitro, se han puesto en práctica distintos métodos y estrategias para lograr dicho objetivo. En los primeros intentos de cultivo de células espermáticas, se intentó cultivar órganos enteros, como los testículos de ratones recién nacidos, o fragmentos grandes de tejido testicular, sin unas condiciones de cultivo demasiado definidas. Se obtuvieron

resultados muy variables que iban desde la degradación y muerte celular a la diferenciación de espermatogonias en espermatoцитos primarios (28, 29). En los años 60 y 70 del siglo pasado, se llevaron a cabo los primeros ensayos para identificar componentes específicos de los medios de cultivo utilizados, así como las condiciones importantes para la supervivencia y diferenciación de las células espermáticas in vitro. En estos ensayos se concluyó que: (a) la espermatogénesis in vivo ocurre en los mamíferos a una temperatura inferior a la del resto del cuerpo; (b) una atmósfera rica en oxígeno puede ser tóxica para las células en cultivo; (c) el piruvato, glutamina y vitaminas A, C y E, cuando se añaden al medio de cultivo, favorecen la viabilidad de las células en cultivo; (d) las gonadotropinas no son esenciales para el cultivo de las células germinales; (e) la diferenciación y proliferación de la línea germinal masculina puede ser verificada por marcaje con timidina tritiada; y (f) los procesos celulares in vitro deben ocurrir con tiempos similares a los correspondientes in vivo (29).

Posteriormente, se intentó el cultivo de las células germinales en suspensiones celulares, volviendo más tarde al cultivo de fragmentos de túbulos seminíferos. En los estudios más recientes, se trata de imitar al máximo en los cultivos las condiciones a las que están sometidas las células germinales en los testículos. Entre ellas, destacamos una temperatura inferior a los 37° C, mantenimiento del contacto con las células de Sertoli, adición de hormonas y otros factores presentes en el testículo, etc.

En pacientes con azoospermia obstructiva, es decir, con espermatogénesis completa, tras 24 horas de cultivo con FSH recombinante (rFSH), se logró la reactivación de las divisiones meióticas a partir de espermatoцитos primarios, al mismo tiempo que se comprobó el efecto estimulador de la espermiogénesis de la rFSH (30, 31). Así mismo, se demostró que las células germinales no necesitan un contacto directo con las células de Sertoli para completar determinados procesos meióticos, morfogenéticos y moleculares, aunque el porcentaje de espermatoцитos primarios y espermátidas redondas que continuó con la espermatogénesis in vitro fue muy pequeño (<1%) (32).

La FSH actúa indirectamente sobre el proceso espermatogénico, actuando sobre las células de Sertoli, que a su vez actúan sobre las células germinales, por ello, la pérdida de "contacto" entre las células de Sertoli y las células germinales puede ser una causa de azoospermia no obstructiva (30). La FSH protege las células germinales de la apoptosis, probablemente dándoles una mayor potencial de desarrollo, efecto mimetizado por la pentoxifilina (33). Por otra parte,

la concentración en sangre de esta hormona parece jugar un papel clave en el desarrollo de la espermatogénesis in vitro de los pacientes con azoospermia no obstructiva, ya que aquellos pacientes con una concentración de FSH en sangre superior a 20 UI/l no muestran progresión de sus células germinales cultivadas in vitro, mientras que aquellos con concentraciones comprendidas entre 10-20 UI/l logran superar el bloqueo de la espermatogénesis que sufren in vivo (34).

La pérdida de sensibilidad del receptor de FSH de las células de Sertoli en pacientes con azoospermia no obstructiva y con elevadas concentraciones de FSH en sangre puede estar implicada en el fallo de la espermatogénesis in vitro de los mismos. En pacientes con azoospermia obstructiva, se ha comprobado que el aumento artificial de la concentración de AMPc intracelular mediante tratamiento con pentoxifilina mimetiza el efecto de la FSH sobre la supervivencia y diferenciación in vitro de células germinales cultivadas junto con células de Sertoli, siendo por tanto una posible solución para los pacientes descritos anteriormente (33).

Los distintos efectos de la FSH in vivo e in vitro pueden explicar el comportamiento diferente de las células germinales de pacientes con azoospermia no obstructiva en ambos sistemas. La testosterona potencia el efecto de la FSH al mismo tiempo que preserva la viabilidad de las células de Sertoli en cultivo. También, puede estimular los cambios nucleares y del acrosoma que se dan en los procesos postmeióticos (27, 33). Por ello, tanto la FSH como la testosterona inducen incrementos significativos de la maduración al principio y al final de la espermiogénesis (27).

Las células de Sertoli juegan un papel muy importante en la espermatogénesis in vitro, al igual que lo hacen in vivo. Producen la secreción del factor de célula madre, el cuál evita la apoptosis y es esencial para la diferenciación y proliferación de las células espermáticas in vitro (29).

Otro método utilizado para llevar a cabo la espermatogénesis in vitro consiste en el cocultivo de células germinales con células Vero aisladas de hígado de mono verde africano, tipo celular que ayuda a la nutrición de las células espermáticas. Mediante esta técnica, se ha logrado superar la detención de la espermatogénesis a nivel de espermátocitos primarios en pacientes con azoospermia no obstructiva, tras 3-5 días de cultivo, obteniendo espermátidas en elongación (46%), elongadas (19%) e incluso espermatozoides maduros, aunque en un porcentaje muy bajo (2,7%), (35, 36). Sin embargo, la utilización de células Vero conlleva un riesgo de infección y alteración de las cé-

lulas humanas que podría ser evitado mediante la búsqueda de células humanas que realizaran las mismas funciones y consiguieran la maduración in vitro de los espermátocitos primarios (36).

Existen también otros factores cuyo efecto positivo sobre la espermatogénesis in vitro ha sido demostrado recientemente. Tanaka et al. (36) han encontrado este efecto positivo en el fluido de la red testicular, así como en el fluido sintético del oviducto, obteniendo incluso mejores resultados que con la combinación de FSH y testosterona.

Las células peritubulares aumentan la supervivencia y secreción de células de Sertoli en cultivo y producen el factor inhibidor de leucemia (LIF), el cual promueve la supervivencia y proliferación in vitro de las células germinales. Además, las células peritubulares liberan retinol, que ayuda a la diferenciación de dichas células en los túbulos seminíferos, así como el factor-1 de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) y el factor- $\alpha$  de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ ) que estimulan la diferenciación de espermatogonias en fragmentos de testículos de rata. Por otra parte, el estradiol previene la apoptosis de espermátocitos primarios en segmentos de túbulos seminíferos in vitro, el factor de crecimiento de nervios, producido por células germinales meióticas y postmeióticas, estimula la síntesis de DNA en espermátocitos de rata en fase de preleptotene; el esteroide activador de la meiosis, producido por el ovario y testículo, encontrado entre células de Leydig, inicia la meiosis en células germinales de testículos de feto de ratón tras 6 días en cultivo (29).

Los factores necesarios para el mantenimiento de las espermatogonias in vitro, en el ratón, han sido establecidos recientemente (37). Este último estudio revela que: (a) la temperatura de cultivo (32 vs. 37°C) no provoca diferencias significativas en el mantenimiento de las espermatogonias; (b) el cultivo a largo plazo de espermatogonias sólo es posible cuando éstas son cultivadas junto a células que faciliten su nutrición y mantenimiento, como las células L (fibroblastos) o la línea celular OP de la médula ósea; y (c) en general, los agentes que bloquean la diferenciación de las espermatogonias al ser añadidos al cultivo ayudan a mantener dichas espermatogonias indiferenciadas, mientras que aquellos factores, como las células de Sertoli, que promueven la espermatogénesis, reducen el número de espermatogonias en cultivo.

Según el nivel al cual queda bloqueada la espermatogénesis, varía la capacidad de las células germinales de recuperar dicho proceso in vitro. De hecho, cerca de un 23% de los pacientes con azoospermia no obstructiva con bloqueo a nivel de los espermátocitos

primarios logra obtener in vitro espermatoцитos secundarios o espermátidas de distintos estadios de desarrollo, mientras que en aquellos con detención a nivel de los espermatoцитos secundarios, en la totalidad de los casos (3/3) se recupera la espermatogénesis, y alrededor del 57% de los pacientes con bloqueo a nivel de las espermátidas redondas alcanzan el estadio de espermátidas elongadas (34).

### **Capacidad de fecundación de los gametos diferenciados in vitro**

Aslam y Fishel (38) demostraron que no hay diferencias significativas en la fecundación de ovocitos de hámster entre las células germinales, cultivadas durante 42-48 h, procedentes de pacientes con azoospermia no obstructiva y células germinales de pacientes con azoospermia obstructiva, siempre y cuando se comparen los mismos estadios celulares en ambos grupos. También, mostraron que el cultivo a corto plazo (42-48 h) de células espermáticas inmaduras no mejora el porcentaje de fecundación de las mismas de forma significativa frente al mismo tipo celular obtenido in vivo en las espermátidas redondas (25,9 vs 23,1%), en las espermátidas en elongación (31,4 vs 28,1%) y en las elongadas (41,4 vs 37,8%).

En los estudios realizados en el ratón, se ha conseguido obtener descendencia normal y fértil a partir de espermátidas redondas tras el cultivo de espermatoцитos con células de Sertoli. En concreto, (39) observaron que entre el 3,2 y el 6,1% de los ovocitos inyectados da lugar a descendencia.

En toros, se consiguió cultivar espermatoцитos secundarios durante 18 h para obtener espermátidas redondas. Éstas espermátidas redondas fueron inyectadas en ovocitos de vaca y se dejaron progresar hasta el estadio de blastocisto. Se comprobó que estos embriones tenían un número normal de cromosomas, incluyendo los cromosomas sexuales, y que el número de células era similar al que presentan los blastocistos desarrollados in vivo (40).

Los primeros nacimientos de bebés sanos gracias a la recuperación de la espermatogénesis in vitro se produjeron hace relativamente poco tiempo (41). Se había logrado superar la detención de la espermatogénesis a nivel de los espermatoцитos primarios con el cultivo in vitro, dando lugar a gametos útiles para la fecundación asistida por micromanipulación. Se consiguió el nacimiento de un par de gemelos y otro bebé, los tres sanos y sin anomalías de ningún tipo. Posteriormente, utilizando espermátidas elongadas, se consiguió un cuarto embarazo que finalizó con el nacimiento de una niña sana procedente de un padre

con fallo completo de la espermiogénesis, es decir, con la espermatogénesis detenida a nivel de las espermátidas redondas (41).

Tras la espermatogénesis in vitro, llevada a cabo a partir de espermatogonias y espermatoцитos de pacientes con azoospermia no obstructiva, en un medio suplementado con rFSH y testosterona, junto con células de Sertoli y células Vero, se obtuvieron espermátidas en distintos estadios (redondas, en elongación anormales, en elongación normales y elongadas) que fueron inyectadas en ovocitos para comprobar su poder de desarrollo embrionario (27). Los resultados mostraron bajos porcentajes de fecundación (37,5% en espermátidas redondas y 30,5% en espermátidas en elongación y elongadas, ambos tipos de morfología normal) y todos los embriones analizados (n=15) tenían una constitución anormal de los cromosomas sexuales.

### **ESPERMATOGÉNESIS IN VITRO E IN VIVO**

Este apartado tiene como objetivo mostrar las posibles ventajas que puede ofrecer el cultivo de células espermáticas para los pacientes con azoospermia no obstructiva y comparar esta técnica con la espermatogénesis in vivo.

En primer lugar, la espermiogénesis in vitro es mucho más corta (24-72 h) que in vivo (16-22 días) (30, 38, 42). Tal vez, esta mayor velocidad sea debida a una descoordinación en la espermiogénesis que produciría espermátidas anormales, o a la ausencia o mayor dilución de antagonistas del factor de crecimiento que pueden estar presentes en el testículo, pero no en los cultivos in vitro. Además, pueden haber diferencias en la síntesis y actividad de las hormonas y de los receptores de los factores de crecimiento entre los sistemas in vivo e in vitro.

Otra hipótesis sugiere que las condiciones del cultivo pueden hacer que se evite un punto de control del desarrollo, el cual controlaría in vivo la sincronización de cada uno de los procesos durante la espermiogénesis (30, 31). Esta aceleración se observa tanto en los procesos post-meióticos como en los meióticos, siendo los primeros donde la aceleración in vitro es mayor (31). Sin embargo, existen resultados contradictorios respecto a esta aceleración de la espermatogénesis in vitro en especies como la rata, donde parece ser que no se produce (43). Estudios recientes (36) han demostrado que, mientras la diferenciación de un espermatoцитo primario humano en cuatro espermátidas redondas dura unos 32 días in vivo, in vitro este proceso se completa en un período de 2-5 días, ha-

biéndose completado ya la impronta genética en el espermatozoido primario o bien durante el proceso meiótico *in vitro*.

En segundo lugar, el cultivo *in vitro* plantea aplicaciones útiles en el campo de la reproducción asistida. El cultivo *in vitro* de espermátidas anormales, que no se pueden distinguir en muestras frescas, puede ser útil para seleccionar espermátidas viables y con pleno potencial de desarrollo para la reproducción asistida, ayudando a disminuir los problemas de identificación inherentes a la inyección de células germinales, principalmente de espermátidas redondas, que ya hemos descrito en la primera parte (30, 38). Los pacientes con fallo completo de la espermiogénesis muestran mayor frecuencia de células germinales apoptóticas, las cuales presentan daños en el DNA, que los pacientes en los que ocasionalmente aparecen espermátidas elongadas o espermatozoides (42).

Frecuentemente, es difícil diferenciar las espermátidas redondas con daños en el DNA de aquellas sanas y viables, riesgo que se incrementa con el fallo completo de la espermiogénesis, lo cual explica la disminución en la eficacia de ROSI en dichos pacientes y la gran utilidad del cultivo de células espermáticas en este aspecto. Tesarik et al. (41) también confirmaron que las espermátidas de hombres con fallo completo de la espermiogénesis pueden desarrollarse *in vitro*, aunque sólo las células germinales no apoptóticas pueden llevar a cabo una diferenciación morfológica y post-meiótica *in vitro*. Por otra parte, confirmaron que la frecuencia de células germinales apoptóticas es menor después del cultivo que antes, debido a que las células apoptóticas presentes al inicio del cultivo se han desintegrado al final del mismo, mientras que la diferenciación de espermatozoides primarios sanos da lugar a espermatozoides secundarios y a las espermátidas que sustituyen a las células apoptóticas desaparecidas.

En tercer lugar, la media del porcentaje de fecundación, en humanos con espermátidas redondas obtenidas *in vivo*, es del 40,1% (a partir de los datos reflejados en la tabla 1) frente a la obtenida con espermátidas redondas diferenciadas *in vitro* que es del 31,7% (a partir de 27,38). Sin embargo, el cultivo *in vitro* permite obtener estadios más avanzados en las células espermáticas de pacientes con bloqueo de la espermatogénesis. Por tanto, se consigue, por ejemplo, que las espermátidas redondas se elonguen y puedan dar unos mejores resultados de fecundación y obtención de descendencia. Esto se cumple principalmente en pacientes con bloqueo de la espermatogénesis, ya que los daños en el DNA que llevan las espermátidas suelen acarrear problemas en los embriones

obtenidos con espermátidas redondas obtenidas *in vivo*, debido principalmente a la apoptosis de muchas de estas células (44). Por el contrario, el cultivo de espermátidas redondas permite escoger aquellas que siguen un patrón de diferenciación correcto y que presentan una supuesta normalidad genética. Por tanto, se puede aconsejar que las espermátidas redondas obtenidas *in vivo* sean cultivadas hasta su elongación previamente a su inyección en los ovocitos en pacientes que exhiben bloqueo de la espermiogénesis (44).

En el ratón, los cigotos procedentes de la inyección de espermátidas redondas desarrolladas *in vivo* presentan un mayor potencial de desarrollo que aquellos obtenidos con espermátidas redondas obtenidas *in vitro*. Además, *in vitro*, se obtienen mayor número de espermátidas de 1-4 flagelos, mientras que, *in vivo*, las espermátidas solo tienen un flagelo. Esta circunstancia podría ser debida al hecho de que, *in vitro*, se inhibe algún mecanismo que, *in vivo*, evita la duplicación del centrosoma (39). En el ratón, la media del porcentaje de fecundación, teniendo en cuenta los datos de la tabla 1, con espermátidas redondas obtenidas *in vivo* es de 62,2%, mientras que (39) lograron alcanzar un porcentaje de fecundación entre el 85,4 y el 96,7%. Aunque *a priori* pueda parecer que la capacidad de fecundación sea mayor en las espermátidas desarrolladas *in vitro*, según estos porcentajes, hay que tener en cuenta que, en la tabla 1, se incluyen trabajos más antiguos, y por tanto las técnicas de inyección no estaban igual de desarrolladas que en el trabajo (39). Estos datos indican que hace falta más investigación con espermátidas desarrolladas *in vitro* para poder obtener una comparación fiable con los resultados obtenidos con espermátidas diferenciadas *in vivo*. El porcentaje de fecundación alcanzado por las espermátidas redondas diferenciadas *in vitro* (85,4-96,7%) frente al porcentaje de fecundación alcanzado con espermatozoides primarios (84-87%) y secundarios (75%) obtenidos *in vivo* puede hacer pensar que, en el ratón, el desarrollo de espermátidas *in vitro* puede suponer una ventaja frente a la utilización en fecundación asistida de células espermáticas más inmaduras, aunque éstas hayan sido obtenidas *in vivo*.

En vacas, se comparó la inyección de ovocitos con espermátidas redondas aisladas *in fresco* con la inyección de espermátidas redondas desarrolladas *in vitro* (40). Se pudo comprobar que los porcentajes de división de los embriones eran similares en ambos casos (31% en el primer caso y 37,8% en el segundo), así como los porcentajes de desarrollo hasta el estadio de mórula y blastocisto (11,1 vs 18,2% y 4,2 vs 11,4%, respectivamente).

Pese a la obtención de descendencia sana en hu-

manos (41), existen riesgos en la aplicación de esta técnica. Entre ellos, podemos mencionar: (a) posibles efectos negativos sobre el DNA debido a la ocurrencia de las divisiones celulares tan rápidas que se observan *in vitro*; (b) los posibles daños genéticos que determinan la detención de la espermatogénesis pueden ser transferidos a los hijos, puesto que un 11,5% de los pacientes con azoospermia no obstructiva estudiados sufren un bloqueo pre-meiótico y, en la mitad de estos casos, este bloqueo pre-meiótico se debe a la presencia de daños genéticos (45).

### CONCLUSIONES

La utilización de células espermáticas inmaduras ofrece una esperanza de paternidad a hombres que sufren un bloqueo de la espermatogénesis. En humanos, se ha logrado obtener descendencia a partir de la inyección en ovocitos de espermátidas redondas, en elongación o elongadas, así como de espermaticitos secundarios. Sin embargo, todavía no se ha conseguido obtener embarazos a término utilizando espermaticitos primarios. En el ratón, en cambio, se ha logrado obtener descendencia, incluso, a partir de espermaticitos primarios y secundarios obtenidos *in vivo*. Los resultados obtenidos hasta el momento actual tras inyección de células espermáticas inmaduras son peores que los obtenidos tras inyección de espermatozoides maduros. Se obtienen menores porcentajes de fecundación y, en general, una reducción del potencial de desarrollo embrionario. Además, se plantean los problemas de reconocimiento de las espermátidas redondas que sean viables y capaces de llevar adelante dicho desarrollo embrionario, así como confirmar que las células espermáticas han sufrido todos los procesos necesarios, incluyendo la impronta genética, para dar lugar a descendencia sana y normal.

Algunos de estos problemas pueden ser superados gracias al cultivo *in vitro* de las células espermáticas. El cultivo de dichas células permite diferenciar aquellas células espermáticas sanas y viables de aquellas que sufren algún daño asociado con apoptosis y/o disminuir el potencial de desarrollo embrionario. También, permite obtener células espermáticas más maduras e incluso superar *in vitro* el bloqueo de la espermatogénesis que padecen los pacientes *in vivo*, mejorando, por tanto, sus expectativas de paternidad. No obstante, es necesario averiguar si la maduración de las células germinales masculinas en un ambiente distinto al *in vivo* ejerce efectos negativos a largo plazo sobre la descendencia, así como evitar la transmisión de deficiencias genéticas a futuras generaciones.

### AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido realizado gracias a la ayuda FIS 01/0138 del "Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo" y la ayuda BFI2003-04761 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Sofikitis N, Miyagawa I, Yamamoto Y, Loutradis D, Mantzavinos T, Tarlatzis V.: Micro- and macro-sequences of ooplasmic injections of early haploid male gametes. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 197-212.
2. Tesarik J, Rolet F, Brami C, Sedbon E, Thorel J, Tibi C, Thébault A.: Spermaticid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment on infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996; 11: 780-783.
3. Sousa M, Barros A, Tesarik J.: Current problems with spermaticid conception. *Human Reprod* 1998; 13: 255-258.
4. Kahraman S, Polat G, Samli M, Sözen E, Özgün OD, Dirican K, Özbiçer T.: Multiple pregnancies obtained by testicular spermaticid injection in combination with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 104-110.
5. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Nuhoglu A.: Progression to the blastocyst stage of embryos derived from testicular round spermaticids. *Hum Reprod* 2000; 15: 1377-1382.
6. Sofikitis NV, Miyagawa I, Agapitos E, Pasyianos P, Toda T, Hellstrom W, Kawamura H.: Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11: 335-341.
7. Sofikitis NV, Toda T, Miyagawa I, Zavos P, Pasyianos P, Mastelou E.: Beneficial effects of electrical stimulation before round spermaticid nuclei injections into rabbit oocytes on fertilization and subsequent embryonic development. *Fertil Steril* 1996; 65: 176-185.
8. Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R.: Birth or normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermaticids. *Dev Biol* 1994; 91: 7460-7462.
9. Ogura A, Yamamoto Y, Suzuki O, Takano K, Wakayama T, Mochida K, Kimura H.: *In vitro* fertilization and microinsemination with round spermaticids of propagation of nephrotic genes in mice. *Theriogenology* 1996; 45: 1141-1149.
10. Kimura Y, Yanagimachi R.: Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermaticids can develop into normal offspring. *Development* 1995; 121: 2397-2405.

11. **Sakurai A, Oda S, Kuwabara Y, Miyazaki S.:** Fertilization, embryonic development, and offspring from mouse eggs injected with round spermatids combined with Ca<sup>2+</sup> oscillation-inducing sperm factor. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 132-138.
12. **Sousa M, Mendoza C, Barros A, Tesarik J.:** Calcium responses of human oocytes after intracytoplasmic injection of leukocytes, spermatocytes and round spermatids. *Mol Human Reprod* 1996; 2: 853-857.
13. **Tesarik J, Mendoza C.:** Genomic imprinting abnormalities: a new potential risk of assisted reproduction. *Mol Human Reprod* 1996; 2: 295-298.
14. **Ziyyat A, Lefèvre A.:** Differential gene expression in pre-implantation embryos from mouse oocytes injected with round spermatids or spermatozoa. *Hum Reprod* 2001; 16: 1449-1456.
15. **Sasagawa I, Tateno T, Yazawa H, Ichinayagi O, Ishigooka M, Nakada T.:** Round spermatids from hybrid sterile mice can initiate normal embryo development. *Hum Reprod* 1998; 13: 3099-3102.
16. **Vanderzwalmen P, Zech H, Birkenfeld A, Yemini M, Bertin G, Lejeune B et al.:** Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation. *Hum Reprod* 1997; 12: 1203-1213.
17. **Barak Y, Kogosowski A, Goldman S, Soffer Y, Gonen Y, Tesarik J.:** Pregnancy and birth after transfer of embryos that developed from single-nucleated zygotes obtained by injection of round spermatids into oocytes. *Fertil Steril* 1998; 70: 67-70.
18. **Fishel S, Green S, Hunter A, Lisi F, Rinaldi L, Lisi R, McDermott H.:** Human fertilization with round and elongated spermatids. *Hum Reprod* 1997; 12: 336-340.
19. **Sofikitis NV, Yamamoto Y, Miyagawa I, Mekras G, Mio Y, Toda T et al.:** Ooplasmic injection of elongating spermatids for the treatment of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1998; 13: 709-714.
20. **Araki Y, Motoyama M, Yoshida A, Kim S, Sung H, Araki S.:** Intracytoplasmic injection with late spermatids: a successful procedure in achieving childbirth for couples in which the male partner suffers from azoospermia due to deficient spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997; 67: 559-561.
21. **Kimura Y, Yanagimachi R.:** Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod.* 1995; 53:855-862.
22. **Sofikitis N, Mantzavinos T, Loutradis D, Yamamoto Y, Tarlatzis V, Miyagawa I.:** Ooplasmic injections of secondary spermatocytes for non-obstructive azoospermia. *Lancet* 1998; 351: 1177-1178.
23. **Kimura Y, Tateno H, Handel MA, Yanagimachi R.:** Factors affecting meiotic and developmental competence of primary spermatocyte nuclei injected into mouse oocytes. *Biol Reprod* 1998; 59: 871-877.
24. **Ogura A, Suzuki O, Tanemura K, Mochida K, Kobayashi Y, Matsuda J.:** Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Dev Biol* 1998; 95: 5611-5615.
25. **Sasagawa I, Kuretake S, Eppig J, Yanagimachi R.:** Mouse primary spermatocytes can complete two meiotic divisions within the oocyte cytoplasm. *Biol Reprod* 1998; 58:248-254.
26. **Toppari J, Eerola E, Parvinen M.:** Flow cytometric DNA analysis of defined stages of rat seminiferous epithelial cycle during in vitro differentiation. *J Androl* 1985; 6: 325-333.
27. **Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Barros A.:** Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. *Human Reprod* 2002; 17: 161-172.
28. **Abe S.:** Differentiation of spermatogenic cells from vertebrates in vitro. *Int Rev Cytol* 1987; 109: 159-209.
29. **Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT.:** Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology* 2003; 59: 73-86.
30. **Tesarik J, Greco E, Rienzi L, Ubaldi F, Guido M, Cohen-Bacrie P, Mendoza C.:** 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* 1998; 13: 2772-2781.
31. **Tesarik J, Mendoza C, Greco E.:** In-vitro maturation of immature human male germ cells. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 166: 45-50.
32. **Tesarik J, Mendoza C, Anniballo R, Greco E.:** In-vitro differentiation of germ cells from frozen testicular biopsy specimens. *Hum Reprod* 2000; 15: 1713-1716.
33. **Tesarik J, Mendoza C, Greco E.:** The effect of FSH on male germ cell survival and differentiation in vitro is mimicked by pentoxifylline but not insulin. *Mol Human Reprod* 2000; 6: 877-881.
34. **Tesarik J, Balaban B, Isiklar A, Alatas C, Urman B, Aksoy S, Mendoza C, Greco E.:** In -vitro spermatogenesis resumption in men with maturation arrest: relationship with in-vivo blocking stage and serum FSH. *Human Reprod* 2000; 15: 1350-1354.
35. **Cremades N, Bernabeu R, Barros A, Sousa M.:** In-vitro maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells. *Hum Reprod* 1999; 14: 1287-1293.
36. **Tanaka A, Nagayoshi M, Awata S, Mawatari Y, Tanaka I, Kusunoki H.:** Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 1: 795-801.
37. **Nagano M, Ryu B, Brinster C, Avarbock M,**

- Brinster R.:** Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod* 2003; 68: 2207-2214.
38. **Aslam I, Fishel S.:** Evaluation of the fertilization potential of freshly isolated, in-vitro cultured and cryo-preserved human spermatids by injection into hamster oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14: 1528-1533.
39. **Marh J, Tres L, Yamazaki Y, Yanagimachi R, Kierszenbaum A.:** Mouse round spermatids developed in vitro from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into in vivo-developed mature oocytes. *Biol Reprod* 2003; 69: 169-176.
40. **Goto K, Kinoshida A, Nakanishi Y, Ogawa K.:** Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of in-vitro derived spermatids into bovine oocytes. *Hum Reprod* 1996; 11: 824-829.
41. **Tesarik J, Bahceci M, Özcan C, Greco E, Mendoza C.:** Restoration on fertility by in-vitro spermatogenesis. *Lancet* 1999; 353: 555-556.
42. **Tesarik J, Mendoza C, Greco E.:** In vitro culture facilitates the selection of healthy spermatids for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1999; 72: 809-813.
43. **Jegou B, Le Magueresse-Battistoni B, Gerard N.:** Is the in vitro maturation of germ cells accelerated in co-culture with Sertoli cells? *Mol Cell Endocrinol* 2001; 183: 195.
44. **Tesarik J, Greco E.:** Assisted reproduction for testicular failure: management of germ cell maturation arrest. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11: 283-288.
45. **Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Garolla A, Ferlin A.:** In-vitro spermatogenesis. *Lancet* 1999; 353: 1707-1708.