

## ARTÍCULO DE REVISIÓN / REVIEW

# Usos potenciales de germoplasma animal masculino con fines de preservación de fauna silvestre

## Potential use of animal male germplasm for the preservation of endangered species

Francisco Cabrera<sup>1</sup>, Andrés Caicedo<sup>2</sup>, Pedro M. Aponte<sup>1,3,\*</sup>

DOI:10.21931/RB/2017.02.04.10

**RESUMEN**

El germoplasma animal comprende células o tejidos que pueden generar nuevos individuos. Su preservación y uso puede instrumentarse en la reproducción de animales en peligro de extinción. El germoplasma animal, además de los gametos, incluye células diploides como las células madre, potencialmente capaces de dividirse indefinidamente. Las células madre espermatogoniales (CMEs) generan los espermatozoides en el testículo (espermatogénesis). Las CME ofrecen múltiples opciones biotecnológicas. A diferencia de las células madre ovogoniales (hembras), numerosas CME pueden ser obtenidas durante el periodo postnatal prepuberal pre-meiosico. Estas células pueden ser aisladas, amplificadas in vitro y criopreservadas, para así crear líneas celulares. Las CME pueden inducirse a diferenciarse in vivo e in vitro. Las metodologías in vivo, están basadas en el trasplante de CMEs del testículo de un animal donador al testículo de otro receptor sin espermatogénesis, técnicas ya establecidas en animales de laboratorio con potencial para utilizarse en animales domésticos y silvestres. Estos últimos, podrían donar CMEs y animales de especies filogenéticamente relacionadas no amenazadas serían receptores para producir espermatozoides de la especie amenazada. Existen técnicas de trasplante de material testicular preservado de diversos animales al tejido subcutáneo de ratones, donde se desarrolla la espermatogénesis completa. La espermatogénesis in vitro está disponible en ratones. Independientemente de la metodología utilizada, los espermatozoides obtenidos de CME pueden utilizarse en técnicas de reproducción asistida para generar embriones y/o nuevos individuos a fin de repoblar ecosistemas en desequilibrio o aumentar las tasas de mejoramiento genético en sistemas de producción animal.

**Palabras clave:** Reproducción animal; Germoplasma; Espermatozoides; Espermatogénesis; Especies en peligro; Biotecnología

**ABSTRACT**

Animal germoplasm comprises cells or tissues that can be used to generate new individuals. It can be used for endangered species reproduction. Besides gametes, animal germoplasm also includes diploid cells such as stem cells, potentially able to divide indefinitely. Spermatogonial stem cells (SSCs) give rise to sperm in the testis (spermatogenesis). SSCs offer many biotechnological possibilities. Contrary to the female oogonial stem cells, numerous SSCs can be obtained during the postnatal prepubertal pre-meiotic period. SSCs can be isolated, amplified in vitro and cryopreserved to establish cell-lines. SSCs can also be induced to differentiate in vivo and in vitro. In vivo methods are based on the transplantation of SSCs from a donor testis to a recipient with endogenous spermatogenesis depleted. These techniques have been established mainly in laboratory rodents and have promising potential for domestic and wild animals. The last could be used as donors of SSCs and recipients could be common phylogenetically-related, non-threatened domestic species. Thus, domestic males would eventually produce endangered species sperm. Testicular cells or tissues can also be transplanted to the back-skin of mouse where spermatogenesis resumes and foreign sperm generates, as tested in many species. Spermatogenesis in vitro has been accomplished only in mice. Regardless of the method used, sperm coming from SSCs could be used through artificial reproductive techniques to generate embryos and new individuals to repopulate unstable ecosystems or to genetically improve animal production systems

**Keywords:** Animal Reproduction; Germplasm; Spermatozoa; Spermatogenesis; Endangered species; Biotechnology

### Introducción

El germoplasma animal comprende todos aquellos recursos genéticos, bajo la forma de células o tejidos, con posibilidad de utilización en la generación nuevos individuos, con la consiguiente transmisión de información genética de una generación a la siguiente. Su colecta y preservación puede ser realizada con fines de investigación, conservación y reproducción de una especie determinada. La concepción tradicional del uso de germoplasma animal con fines reproductivos se ha limitado a la posibilidad de almacenamiento y manipulación de gametos (espermatozoides y ovocitos). Sin embargo, los diferentes tipos de células madre generadoras de estos gametos (pertenecientes a la llamada línea germinal), ofrecen posibilidades de reproducción por vías biotecnológicas alternativas y sustentables. Estos tipos celulares diploides contrastan en su posibilidad de división teóricamente indefinida con las células haploides terminalmente diferenciadas correspondientes a los gametos, que en los bancos de germoplasma corrientemente en uso tienen la desventaja de

ser recursos genéticos finitos. Durante la historia contemporánea han ido apareciendo sucesivamente cuatro generaciones de biotecnologías reproductivas.<sup>1</sup> Las tres primeras generaciones (cuyas tecnologías de base principales incluyen la Inseminación artificial, transferencia de embriones y la fertilización in vitro) están basadas en el uso de germoplasma gamético. La cuarta generación, en plena vigencia en la actualidad, involucra la utilización de otros tipos celulares diploides germinales, e incluso células somáticas con pluripotencialidad inducida (iPS)<sup>2</sup>.

#### Células madre espermatogoniales

Todos los órganos de los animales adultos presentan células madre que sostienen su funcionalidad. Estas células se organizan en torno a los llamados sistemas de célula madre que le dan protección a estas células en la medida que estas se renuevan a sí mismas (autorenovación clonal) y a la vez generan células

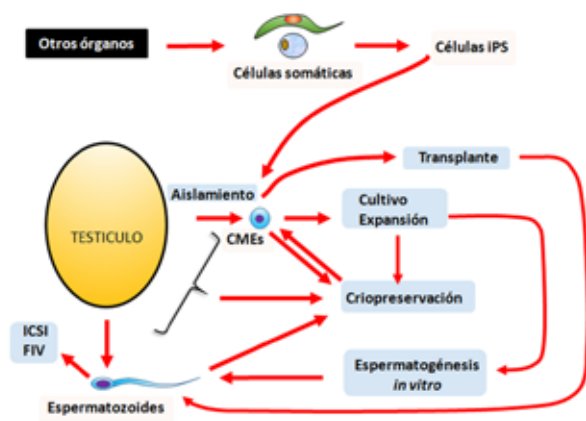
<sup>1</sup>Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Colegio de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina Veterinaria, Campus Cumbayá, Diego de Robles y Vía Interoceánica, 170157 Quito, Ecuador

<sup>2</sup>Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Colegio de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina, Campus Cumbayá, Diego de Robles y Vía Interoceánica, 170157 Quito, Ecuador

<sup>3</sup>Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Campus Cumbayá, Diego de Robles y Vía Interoceánica, 170157 Quito, Ecuador

\*Autor de correspondencia: pmaponte@usfq.edu.ec

hijas comprometidas a la diferenciación y que cumplirán con la funcionalidad del órgano. Tal es el caso del sistema de célula madre responsable de la formación de los gametos masculinos (espermatozoides) en el testículo a través del proceso de la espermatogénesis que incluye diferentes pasos de mitosis, meiosis y diferenciación.<sup>3</sup> Las células madre espermatogoniales (CMEs) son las células madre de la línea germinal sobre las que la espermatogénesis se sustenta. Estas se encuentran dentro del compartimiento basal de los túbulos seminíferos del testículo, (epitelio seminífero) y eventualmente darán origen a los espermatozoides.<sup>3</sup> Como todas las células madre, las CMEs son capaces de dividirse asimétricamente para generar células comprometidas a la vía de la diferenciación (linaje de amplificación de tránsito, espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides) y sus propios clones.<sup>4</sup> En condiciones de emergencia (daño testicular), las CMEs por medio de divisiones simétricas exclusivamente se autorenevan a fin de regenerar su pool original para así generar las cohortes de células diferenciadas que harán de nuevo al testículo funcional. Las CMEs, pertenecientes a la línea germinal, ofrecen múltiples aplicaciones biotecnológicas importantes.<sup>5</sup> A diferencia de sus equivalentes de la línea germinal femenina, las CMEs pueden ser obtenidas en grandes cantidades en animales durante el periodo postnatal prepuberal, cuando todavía estas aún no han entrado en el proceso de meiosis, siendo de esta manera el pool de células madre germinales en la gónada masculina (testículo), altamente prevalente en el periodo mencionado. Una vez que se inicia el periodo pre-puberal, comienza la primera onda espermatogénica que consiste en la ocurrencia de las primeras divisiones asimétricas de las CMEs que conducirán a la primera generación de espermatozoides al momento de la pubertad.<sup>6</sup> Una vez que avanza la primera onda espermatogénica, el porcentaje de CMEs comenzará a disminuir al aumentar progresivamente el número de células en vías de diferenciación dentro del túbulo seminífero, dificultándose así su obtención con alta pureza. Estas células pueden ser aisladas, amplificadas *in vitro* y criopreservadas, lo cual conlleva a la posibilidad de establecer líneas celulares inmortales.<sup>7,8</sup>



**Figura 1.** Resumen de las posibles aplicaciones de las células madre espermatogoniales (CMEs) para la obtención de gametos masculinos (espermatozoides) con fines reproductivos. Las CMEs pueden ser obtenidas a partir de la línea germinal masculina adulta presente en el testículo o alternativamente ser derivadas de células madre pluripotenciales inducidas (iPS) a partir de células somáticas. Las CMEs pueden ser transplantadas a un testículo receptor o cultivadas *in vitro* a fin de obtener espermatozoides. Existen actualmente protocolos para la criopreservación de las células mencionadas en la figura. Los espermatozoides obtenidos se pueden utilizar para fertilizar las especies de interés a través de técnicas de reproducción asistida tales como la inyección intracitoplasmática (ICSI) o la fertilización *in vitro* (FIV).

## Biotecnologías reproductivas y células madre espermatogoniales

La disponibilidad de las tecnologías que utilizan células diploides como germoplasma, conlleva al desarrollo de técnicas con gran incidencia en campos tan diversos como la producción animal, medicina regenerativa y preservación de especies amenazadas o en peligro de extinción. Para este fin, la reproducción animal representa un área primordial. Estos enfoques requieren de un almacenamiento inicial de todo germoplasma animal aprovechable, incluso al momento de fallecer los animales por causas que no conlleven a una pérdida de la integridad de los tejidos o células objeto de estas técnicas. Se hacen necesarios esfuerzos de investigación con el fin de determinar las mejores vías de preservación del germoplasma dada la heterogeneidad de tejidos potencialmente utilizables en diferentes especies animales. Al estar disponibles células germinales diploides en bancos de germoplasma, estas pueden eventualmente ser inducidas a proliferar y entrar a la vía de diferenciación celular tanto *in vivo* como *in vitro*. El objetivo de la diferenciación de las CMEs sería la obtención de espermatozoides de la especie de interés, es decir, de la cual queremos obtener descendencia. Las metodologías de diferenciación *in vivo*, están basadas en el transplante de CMEs del testículo de un animal donador al testículo de un animal receptor cuya producción endógena de espermatozoides ha sido previamente eliminada.<sup>9</sup> Muchas de estas técnicas se han desarrollado en especies murinas, no habiéndose todavía establecido para la mayoría de los animales domésticos y prácticamente siendo inexistentes para su uso en animales silvestres, muchos de los cuales se encuentran amenazados o en peligro de extinción. Estos últimos, podrían ser donadores de CMEs y los animales receptores serían animales de especies filogenéticamente relacionadas y cuya existencia no esté amenazada, de manera que las gónadas de estos últimos produzcan espermatozoides de la especie silvestre (Figura 1). Por ejemplo, CMEs de un felino silvestre en peligro de extinción (*Leopardus pardalis*) han sido transplantadas al testículo de un gato doméstico, el cual es capaz de generar espermatogénesis de la especie foránea.<sup>10</sup> También es posible obtener trozos de tejido testicular previamente obtenidos de especímenes silvestres fallecidos, los cuales pueden ser criopreservados y posteriormente colocados quirúrgicamente en la piel (tejido subcutáneo) de ratones inmunocomprometidos de manera de generar espermatogénesis local con producción de espermatozoides normales en esa xenocalización.<sup>11,12</sup> Incluso, si se xenotransplantan células en suspensión generadas a partir de tejidos testiculares íntegros, las células transplantadas tienen la capacidad de organizarse de novo como tejido testicular en el tejido subcutáneo de los ratones utilizados, obteniéndose asimismo una espermatogénesis normal.<sup>13</sup> En este caso, el tejido testicular se organiza como una mini-gónada sostenida por el tejido circundante, principalmente a través de la neoformación e invasión de vasos sanguíneos provenientes del huésped (ratón). Este neotestículo contribuye a la producción de andrógenos que mantienen los caracteres sexuales del ratón hospedador. Los espermatozoides así producidos pueden entonces utilizarse para la producción de crías de la especie amenazada. Otra posibilidad muy importante sería el desarrollo de la producción de espermatozoides (espermatogénesis) *in vitro*, sólo realizada experimentalmente con éxito hasta el momento en ratones<sup>14</sup> y que evitaría el uso de animales receptores en procedimientos de transplante de CMEs. Estas últimas células generarían los espermatozoides necesarios *in vitro* que serían utilizados en técnicas de reproducción asistida a fin de generar embriones que al ser transplantados a una hembra receptora podrían generar un nuevo individuo, que en el contexto de la reproducción de animales amenazados o en peligro de extinción, sería de gran importancia.

## Perspectivas en investigación

Para el desarrollo de estas biotecnologías reproductivas, se hace necesario inicialmente conocer la morfología y fisiología básica de numerosas especies silvestres como por ejemplo el estudio previo de la morfofisiología de los órganos asociados a la reproducción (gónadas, conjunto de sistemas excretorios y glándulas anexas), así como diferentes aspectos de control hormonal y regulación local a nivel gonadal, para posteriormente contar con técnicas precursoras que incluyan el aislamiento de las células madre de la línea germinal postnatal, su caracterización fenotípica, cultivo, expansión in vitro y finalmente su criopreservación<sup>6</sup>, lo cual ya se ha venido realizando para algunas especies domésticas. Otras técnicas que incluyen la criopreservación de gónadas enteras no han avanzado tan rápidamente, aunque recientemente ha habido avances en seres humanos<sup>15</sup>. Existen pocos reportes en relación al proceso de criopreservación de gónadas enteras o trozos de tejido provenientes de animales domésticos y aún menos de animales silvestres, esto con miras a posibles trasplantes o a la obtención posterior de las células madre germinales contenidas en estos órganos (CMEs o células madre ovogoniales). También se hace necesario explorar la obtención y manipulación de espermatozoides por otras vías, utilizando biotecnologías de la cuarta generación (reservas epididimarias, espermatogénesis in vitro y derivación a partir de células iPS).

## Conclusiones

El éxito de las tecnologías planteadas confluye a través de diversas vías y enfoques en la obtención de gametos con el fin de generar embriones (in vivo o in vitro), que a su vez serían implantados en hembras receptoras, para de esta forma generar individuos con fines tan relevantes como repoblar ecosistemas en desequilibrio o aumentar las tasas de mejoramiento genético en sistemas de producción animal.

## Referencias bibliográficas

1. Thibier M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev* 2005; 45:235–42. doi:10.1051/rnd:2005016.
2. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663–76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
3. de Rooij DG, Griswold MD. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J Androl* 2012; 33:1085–95. doi:10.2164/jandrol.112.016832.
4. Alison MR, Poulosom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197:419–23. doi:10.1002/path.1187.
5. Aponte PM. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells* 2015; 7:669–80. doi:10.4252/wjsc.v7.i4.669.

6. Aponte PM, van Bragt MPA, de Rooij DG, van Pelt AMM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2005; 113:727–42. doi: 10.1111/j.1600-0463.2005.apm\_302. x.
7. Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, Ouden K den, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reprod Camb Engl* 2002;124:85–94. doi: 10.1530/rep.0.1240085
8. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SKM, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* 2009;302:2127–34. doi:10.1001/jama.2009.1689.
9. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11298–302. doi:10.1073/pnas.91.24.11298
10. Silva RC, Costa GMJ, Lacerda SMSN, Batlouni SR, Soares JM, Avelar GF, et al. Germ cell transplantation in felids: a potential approach to preserving endangered species. *J Androl* 2012;33:264–76. doi:10.2164/jandrol.110.012898.
11. Dobrinski I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:137–45. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.06.020.
12. Campos-Junior PHA, Costa GMJ, Avelar GF, Lacerda SMSN, da Costa NN, Ohashi OM, et al. Derivation of sperm from xenografted testis cells and tissues of the peccary (*Tayassu tajacu*). *Reprod Camb Engl* 2014; 147:291–9. doi:10.1530/REP-13-0581.
13. Dobrinski I. De novo morphogenesis of functional testis tissue after ectopic transplantation of isolated cells. *Organogenesis* 2007; 3:79–82. doi:10.4161/org.3.2.4944
14. 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; 471:504–7. doi:10.1038/nature09850.
15. Baert Y, Braye A, Struijk RB, van Pelt AMM, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter in vitro cell dynamics. *Fertil Steril* 2015. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.1134.

**Recibido:** 23 octubre 2017

**Aprobado:** 11 noviembre 2017