

**Cimponeriu Gheorghe Dănuț, Nica Remus Iulian,
Toma Mihai, Berca Lavinia Mariana, Nica Matei Ioan,
Burlibașa Liliana**

Bazele biologice ale spermatogenezei și fertilității masculine



Editura

Hamangiu

1. Organizarea structurală și funcțională a testiculului și spermatogeneza

1.1. Istoricul cunoașterii în domeniul determinării sexului și dezvoltării testiculare

Studiul mecanismelor implicate în determinarea sexuală și în dezvoltarea testiculară a cunoscut o evoluție semnificativă în ultimul secol. Deși la această evoluție au contribuit descoperiri fundamentale din diferite domenii, un rol deosebit revine progreselor înregistrate în embriologie, biologie moleculară și genetică.

Primele descoperiri genetice au fost realizate la începutul secolului XX. În anul 1916, Calvin Bridges a efectuat un studiu esențial asupra cromozomilor sexuali la *Drosophila melanogaster* și a demonstrat că determinarea sexului este dependentă de raportul dintre numărul de cromozomi X și numărul de seturi de autozomi. Astfel, la femele (XX), raportul detectat a fost 2:2, iar la masculi (XY), 1:2. Această observație a pus bazele înțelegerii rolului componentei genetice în procesul de diferențiere sexuală⁽¹⁾. Ulterior, în 1923, Theophilus Shickel Painter a descris pentru prima dată heterozomii umani și a contribuit astfel la identificarea heterozomilor X și Y la om⁽²⁾.

Contribuții importante au fost aduse și în domeniul embriologiei experimentale. Un moment de cotitură a fost reprezentat de experimentele realizate de Alfred Jost în 1947, care a efectuat castrări *in utero* la iepuri, înainte de inițierea diferențierii sexuale. Rezultatele au arătat că, în absența gonadelor, atât embrionii XX cât și cei XY dezvoltau ducte și organe genitale externe de tip feminin. Aceste date au condus la concluzia că dezvoltarea feminină reprezintă calea de bază, pasivă, independentă de influența hormonilor gonadali.

În anii 1950 au fost dezvoltate metodele de analiză citogenetică și au fost identificate și caracterizate din punct de vedere citogenetic primele aneuploidii umane. S-a stabilit că determinarea sexului masculin la mamifere este dependentă de prezența cromozomului Y. Totodată, s-a observat că pacienții cu sindrom Klinefelter (47,XXY) dezvoltă testicule, iar cei cu sindrom Turner (45,X0) dezvoltă ovare; aceste observații au infirmat ipoteza simplistă potrivit

căreia raportul dintre numărul de cromozomi X și numărul de seturi de autozomi este determinantul unic al sexului.

În 1964 a fost raportat primul caz de bărbat cu cariotip 46,XX, o afecțiune ulterior denumită „inversare sexuală” (³). Acești indivizi aveau un fenotip masculin și prezentau infertilitate. Ei au fost investigați în contextul tulburărilor de dezvoltare sexuală.

Contribuții în domeniu au fost furnizate atât de datele de biologie moleculară, cât și de studiile efectuate pe animale model. Începând cu anii 1990, utilizarea tehnicilor de imunohistochimie și hibridizare *in situ* a permis caracterizarea moleculară a celulelor de la nivel testicular aflate în diferite etape de dezvoltare. Animalele model, în special șoarecii transgenici au oferit informații esențiale despre rolul genei SRY în inițierea diferențierii testiculare (^{4,5}). Expresia precoce și adecvată a acestei gene este esențială pentru dezvoltarea normală a testiculelor, în timp ce întârzierea sau expresia insuficientă poate cauza disgeneză gonadală sau formarea de structuri mixte (ex. ovotestis) (^{6,7,8}).

Cunoașterea mecanismelor genetice a fost favorizată și de analiza tulburărilor de dezvoltare sexuală (⁹). Aceste tulburări includ o gamă largă de condiții patologice congenitale care sunt caracterizate prin dezvoltarea atipică a organelor genitale interne și externe. Ele au fost identificate la indivizii cu cariotip 46,XX sau 46,XY, iar cauzele care le-au determinat au fost considerate mutații genetice, anomalii hormonale sau insensibilitatea țesuturilor și organelor la hormonii sexuali (¹⁰). De exemplu, mutațiile în gena SRY pot duce la sindromul Swyer (disgeneză gonadală completă la indivizi 46,XY) (¹¹), în timp ce translocția acestei gene într-un cromozom X poate explica fenotipul masculin la indivizi 46,XX. Totuși, doar 10-15% dintre cazurile de disgeneză gonadală completă 46,XY pot fi atribuite mutațiilor în SRY (¹²). Acest procent, coroborat cu rezultatele furnizate de unele studii recente, sugerează că mecanismele implicate în inversarea sexuală pot să fie mult mai complexe, iar țesutul testicular se poate forma și în absența expresiei SRY în gonadele nediferențiate (¹³).

Noi gene implicate în dezvoltarea testiculară și în diferențierea sexuală au fost identificate începând cu anul 2000 (ex. DHH, HHAT, SOX9) (¹⁴). Mutațiile homozigote în DHH (ex. mutația c.371G>A din exonul 2, 1086delG din exonul 3) au fost asociate cu disgeneza gonadală 46,XY, în timp ce mutațiile în SOX9 au fost asociate cu displazia campomelică, o afecțiune complexă care

afectează scheletul și sistemul reproducător (Canto P, 2004, ^{15, 16, 17}). Investigarea cauzelor genetice ale tulburărilor de dezvoltare sexuală la 165 de tunisieni cu tulburări de diferențiere sau de dezvoltare sexuală care aveau cariotip 46,XY a evidențiat anomalii citogenetice la 30,9% dintre aceștia. Secvențierea probelor de ADN a permis descoperirea unor variante patogene sau potențial patogene în diferite gene (inclusiv în SRY, AR, SRD5A2, ZNRF3, SOX8, SOX9 și HHAT) (¹⁸). Rezultate concordante au fost obținute și în alte populații umane (¹⁹). Consecințele mutațiilor în aceste gene pot fi importante și pentru un spectru mai larg de afecțiuni (^{20, 21}).

Rezultatele oferă dovezi suplimentare privind implicarea dezechilibrelor cromozomiale și a variantelor rare în genele SOX8, ZNRF3 și HHAT în dezvoltarea timpurie a testiculului uman și în tulburările de dezvoltare sexuală.

Cazuri de hermafroditism și virilizare anormală au permis o înțelegere mai amplă a mecanismelor fiziopatologice și a predispoziției pentru aceste afecțiuni. Au fost descrise cazuri de indivizi 46,XX care prezentau atât țesut testicular, cât și ovarian. Aceste forme de hermafroditism adevărat sunt caracterizate prin organe genitale ambigue, iar virilizarea parțială poate fi cauzată de secreția excesivă a hormonilor androgeni care au origine extragonadală (ex. hiperplazia suprarenală congenitală, deficitul de aromatază placentară, tumori secretoare de androgeni sau expunerea maternă la steroizi anabolizanți) (^{22, 23, 24}).

Contribuțiile din domeniul genomicii, susținute de progresele din domeniul bioinformaticii, au permis identificarea unor variante genetice rare asociate cu fenotipuri particulare. Aceste descoperiri au îmbunătățit inclusiv la înțelegerea fiziopatologiei tulburărilor de dezvoltare sexuală și au permis identificarea unor corelații genotip-particularitățile reproductive. Spre exemplu, mutația R124Q în DHH a fost identificată prin analiza exomului și s-a demonstrat rolul său în disgeneza gonadală 46,XY (Werner R, 2015).

1.2. Organogeneza

Mamiferele, inclusiv omul, prezintă dimorfism sexual, care este inițiat încă din perioada prenatală. Dezvoltarea sexuală la mamifere este un proces etapizat, controlat prin mecanisme complexe, genetice, epigenetice și hormonale (^{25, 26}). Dezvoltarea sexuală are trei faze principale: formarea gonadei bipotențiale (gonada indiferentă), determinarea sexuală și diferențierea sexuală. În

timpul dezvoltării testiculului se diferențiază trei tipuri principale de celule: spermatogonii (celule precursorare gametice), celule Sertoli și celule Leydig. Studiile efectuate pe animale au arătat că diferențierea liniilor celulare testiculare este corelată. O etapă esențială este diferențierea celulelor Sertoli; acestea au un rol important în diferențierea și comportamentul celorlalte linii celulare testiculare ⁽²⁷⁾ și în dezvoltarea testiculului ⁽²⁸⁾.

Spermatogeneza și diferențierea sexuală masculină sunt reglate printr-o rețea complexă de semnalizare între diferite tipuri celulare. Date recente arată că, deși celulele Sertoli joacă un rol central în organogeneza testiculară, și celulele interstițiale (ex. celulele Leydig, vasculare, imune și peritubulare) au o contribuție esențială în acest proces. Aceste celule contribuie activ la steroidogeneză, susținerea funcției celulelor stem/progenitoare germinale și la formarea microambientului testicular necesar pentru fertilitate. Celulele interstițiale nu acționează izolat; ele interacționează dinamic cu celulele tubulare (Sertoli și germinale) și influențează maturarea spermatogoniilor, secreția hormonală și reglarea imunologică locală. Celulele Leydig secretă hormoni și factori de creștere care stimulează spermatogeneza, iar celulele vasculare și imune joacă roluri emergente în menținerea homeostaziei testiculare ^(29, 30).

O sursă importantă de identificare a genelor implicate în diferențierea gonadelor și în etiologia tulburărilor de dezvoltare sexuală (ex. criptorhidism, disgeneză testiculară) este reprezentată de secvențierea ARN (ARN-seq). Secvențierea ARN pe probe prelevate din testicule și ovare fetale umane între 6 și 17 săptămâni a identificat peste 22000 de transcripti exprimați diferențiat, dintre care 13145 au avut un profil de expresie corelat cu sexul. O parte dintre acești transcripti (n=1479) au avut o expresie diferențiată încă din săptămâna a șasea; ei corespund unor factori de transcripție, ARNs necodificatoare lungi și gene noi. A devenit astfel evident că există mecanisme moleculare timpurii, care au un rol complex în determinarea sexului ⁽³¹⁾. O analiză transcriptomică a fost efectuată pe aproximativ 10000 de celule testiculare prelevate de la patru băieți aflați în diferite stadii ale pubertății. Rezultatele au fost comparate cu cele obținute pe probe prelevate de la sugari și adulți. S-a constatat că există o expansiune și diferențiere secvențială a spermatogoniilor nediferențiate înainte de inițierea gametogenezei. De asemenea, înainte de prepubertate s-a identificat un progenitor comun pentru celulele Leydig și mioide și două modele transcripționale distincte de celule Sertoli, care converg într-o

populație matură unificată în timpul pubertății. Acest atlas transcripțional obținut oferă o perspectivă detaliată asupra modificărilor celulare și moleculare care însoțesc pubertatea masculină și care contribuie la fertilitatea umană⁽³²⁾. Într-o cercetare recentă au fost identificați 35 de termeni fenotipici în Human Phenotype Ontology, asociați cu 269 de gene unice implicate în dezvoltarea tractului reproductiv masculin. Datele transcriptomice arată că celulele Leydig și Sertoli sunt principalele celule în care se exprimă genele tractului reproductiv masculin și că punctele critice de activare sunt în săptămânile 6, 8 și 16 după concepție. Analiza comparativă cu datele murine a evidențiat diferențe semnificative atât în terminologia fenotipică, cât și în genele asociate cu defectele tractului reproductiv masculin. Aceste rezultate demonstrează necesitatea armonizării datelor obținute la analiza unor specii de animale diferite, pentru a facilita translarea rezultatelor în context uman⁽³³⁾. Datele de transcriptomică prezentate în literatura de specialitate au fost agregate în HumanTestisDB. Aceasta conține date despre 38 de tipuri celulare distincte și le organizează în opt etape de dezvoltare. Astfel, în prezent este disponibilă o perspectivă cronologică a dinamicii celulare și moleculare din testiculul uman. HumanTestisDB include hărți detaliate ale interacțiunilor celulare pentru fiecare etapă de dezvoltare și evidențiază rețele complexe de comunicare din microambientul testicular. Prin compararea acestor interacțiuni între diferite tipuri celulare și stadii de dezvoltare se pot analiza modificările critice care apar în timpul spermatogenezei⁽³⁴⁾.

O hartă ontogenetică a structurii și expresiei moleculare la nivelul testiculelor umane a fost obținută prin analiza imunohistochimică detaliată a dezvoltării testiculului uman fetal (între 8 și 21 de săptămâni de gestație) și prin compararea rezultatelor cu cele obținute pe probe prelevate postnatal (minipubertate, prepubertate și pubertate). S-a constatat că, în testiculele fetale, cordoanele testiculare se formează între săptămânile de gestație 8-14 și separă compartimentele interstițiale și intracordale. Gonadocitele fetale au fost localizate în cordoane și au exprimat markeri precum Testis-Specific Protein Y, OCT4, SALL4 și fosfataza alcalină placentară. Celulele Sertoli au exprimat SOX9, inhibină și hormonul anti-Müllerian, iar celulele Leydig au fost identificate în interstițiu prin marcarea citocromului P450c17 (enzimă microzomală implicată în steroidogeneză) și calretininei (proteină de legare a calciului din familia EF-hand). Celulele mioide peritubulare au fost evidențiate cu α -actină musculară netedă. Markerii de diferențiere au fost evaluați în

dezvoltarea postnatală (minipubertate, prepubertate și pubertate). În stadiile postnatale, markerii gonadocitari (precum Testis-Specific Protein Y) au rămas pozitivi până la vârsta adultă. Celulele Sertoli au continuat să exprime AMH, SOX9 și SF1, iar markerii Leydig (P450c17 și calretinină) au fost activi în minipubertate și pubertate, dar absenți în prepubertate. Expresia receptorului androgen și a α -actinei a fost absentă în minipubertate și prepubertate și a fost observată din nou la pubertate (³⁵).

Diferite tipuri de ARNs necodificatoare -ARNnc (ex. miRNA, lncRNA, piRNA) contribuie la reglarea expresiei genelor țintă și influențează stabilitatea și funcția celulară, iar proteinele de legare la ARNs pot să contribuie la procesele de splicing alternativ. Aceste molecule sunt exprimate în celulele somatice din testiculul uman și sunt implicate în spermatogeneză și în fertilitatea umană (^{36,37}). Spre exemplu, ARNnc din celulele Sertoli sunt implicate în fagocitoză, protecția imunologică și în dezvoltarea celulară, iar cele din celulele Leydig contribuie la steroidogeneză (inclusiv la reglarea sintezei de testosteron). În consecință, alterarea sintezei acestor microARNs poate influența fertilitatea umană (³⁸). MicroARNs sunt implicate în desfășurarea proceselor de diferențiere, proliferare și apoptoză celulară. Datele din 42 de studii, în care a fost analizată expresia miRNAs în testicul, epididim, spermatozoizi, plasmă seminală și vezicule extracelulare, la bărbați fertili și infertili, au fost reevaluate. S-a constatat că fiecare tip de țesut conține un set stabil și specific de microARNs implicate în spermatogeneză și dezvoltarea embrionară. În consecință, aceste molecule sunt considerate o nouă clasă de biomarkeri utili pentru diagnosticul infertilității masculine și pentru dezvoltarea de noi tratamente personalizate (³⁹).

1.2.1. Gonada bipotențială și inițierea diferențierii

Imediat după fecundare, zigotul începe să se dividă și se formează blastomerele (stadiul de blastulă). Urmează stadiul în care există mai mult de 32 de celule (stadiul de morulă), iar după ziua a patra se formează blastocistul.

Gonadele sunt morfologic și funcțional nediferențiate în timpul primelor cinci săptămâni de dezvoltare embrionară. În această perioadă, indiferent de sexul genetic, se formează o gonadă bipotențială, capabilă să se diferențieze în testicul sau în ovar, în funcție de semnalele genetice și moleculare primite.

În săptămâna a cincea de dezvoltare intrauterină, celulele provenite din mezonefros și epiteliul celomic proliferază și formează gonada nediferențiată. La aceste procese participă o serie de factori genetici (ex. GATA4, EMX2, CBX2, SIX1, SIX4, și membri ai familiei IGF). Gonada nediferențiată exprimă simultan factori pro-ovarieni (ex. WNT4, RSPO1, DAX1) și pro-testiculari (ex. SOX9, FGF9) ⁽⁴⁰⁾, precum și factori implicați în proliferarea celulelor somatice (ex. LHX9, WT1, SF1, TCF21, INSR, IGF1R, INSR) (Grinspon RP, 2019, ^{41, 42}).

Celulele germinale primordiale migrează din peretele sacului vitelin către gonadele în formare începând cu săptămânile cinci și șase de dezvoltare intrauterină. Aceste celule, precursorii gameților, colonizează gonada indiferentă. Între săptămânile șase-nouă crește numărul de celule germinale de aproximativ 10 ori (de la 3000 la 30000 celule per testicul). În această perioadă se stabilește un raport specific între celulele germinale și cele somatice; raportul dintre celulele germinale și celulele Sertoli este 1:11, iar între celulele germinale și totalul celulelor somatice este 1:44 ⁽⁴³⁾.

În săptămâna a șaptea, proliferarea cordoanelor sexuale primare în medulara gonadei reprezintă primul semn morfologic al diferențierii testiculare. Aceste cordoane se anastomozează și formează schița rețelei testiculare (*rete testis*), din care ulterior se dezvoltă tubii dreپți ^(44, 45).

Sub influența expresiei genei SRY (localizată în cromozomul Y) celulele de suport din gonada indiferentă se diferențiază în celule Sertoli, iar celulele cu potențial steroidogenic devin celule Leydig. Alte celule stromale se transformă în celule mioide peritubulare, iar gonocitele devin precursorii spermatogoniilor.

Celulele Sertoli reprezintă un tip de celule somatice indispensabile pentru organizarea structurală și funcțională a testiculului. Aceste celule provin din epiteliul celomic al mezonefrosului. În etapele timpurii ale dezvoltării testiculare, celulele pre-Sertoli au reticulul endoplasmic bine dezvoltat, nucleul are formă neregulată, iar nucleolul este proeminent. Toate aceste date indică o activitate biosintetică intensă. Morfologia acestor celule rămâne relativ constantă până în intervalul gestațional cuprins între săptămânile 14 și 20 ⁽⁴⁶⁾.

Inițial, celulele Sertoli au fost considerate simple celule de suport pentru dezvoltarea precursorilor gameților în tubii seminiferi însă cercetările ulterioare au arătat roluri mult mai extinse. În săptămânile șapte-opt de dezvoltare embrionară, celulele pre-Sertoli încep să se organizeze în jurul celulelor

germinale primordiale, formând cordoanele testiculare, structuri solide, fără lumen, care vor evolua ulterior în tubii seminiferi. Aceste celule proliferază intens și stabilesc interacțiuni celulare prin interdigitații și procese citoplasmatice cu celulele vecine, inclusiv cu prespermatogoniile. În această etapă, se formează și albuginea testiculară, un strat de țesut conjunctiv care separă cordoanele testiculare de epiteliul celomic.

Pe lângă rolul lor structural, celulele pre-Sertoli contribuie activ la diferențierea altor tipuri celulare testiculare (ex. celulele Leydig fetale, celulele mioide peritubulare) prin secreția de factori paracrini (ex. Desert Hedgehog - DHH). De asemenea, participă la dezvoltarea rețelei vasculare testiculare și la stabilirea barierelor joncționale dintre celulele Sertoli, care izolează celulele germinale imature (meiotice și post-meiotice) de compartimentul bazal și previne eliberarea lor prematură și participarea la fecundare.

Celulele Sertoli imature exprimă o serie de gene esențiale pentru diferențierea sexuală masculină. Dintre acestea, cei mai cunoscuți reprezentanți sunt SOX9 (care este crucial pentru inițierea diferențierii testiculare), AMH (hormonul anti-Müllerian, care determină regresia ductelor Müller la organisme de sex masculin), DHH (un ligand din calea de semnalizare Hedgehog, implicat în recrutarea celulelor mezonefrotice și în diferențierea celulelor Leydig) (^{47, 48}, Werner R, 2015, Morais da Silva S, 1996).

Celulele Sertoli exprimă și factori de creștere care, prin interacțiunea cu receptori specifici, induc migrarea celulelor din mezonefros. Un exemplu este neurotropina-3 (NT3), un agent chemotactic implicat în atragerea celulelor mezonefrotice și în promovarea formării cordoanelor testiculare (⁴⁹, Bendtsen E, 2003). Analiza promotorului genei NT3 sugerează că aceasta acționează în morfogeneza testiculară în aval de SRY (⁵⁰).

Studiile efectuate pe animale, în special pe șoareci, au oferit dovezi solide privind mecanismele genetice implicate în diferențierea celulelor Sertoli. De exemplu, în gonadele nediferențiate, nu a fost detectată expresia Fgf9, iar Sox9, Rspo1 și Wnt4 se exprimă la niveluri scăzute. Celulele Sertoli exprimă abundant Sox9 și Fgf9, dar expresia Rspo1 și Wnt4 este blocată (⁵¹). Expresia combinată a genelor Sry și Sox9 este necesară și suficientă pentru diferențierea celulelor Sertoli (⁵²). Analizele comparative ale ortologilor SOX9 au confirmat rolul conservat al acestei gene în formarea testiculelor la mamifere și păsări (Morais da Silva S, 1996). Studiile experimentale au demonstrat că, după 48 de ore de expunere la estrogen, nivelurile de ARNm pentru SOX9,

SRY, AMH, FGF9 și PTGDS scad semnificativ. După 96 de ore de la expunerea la estrogen, nivelurile de ARNm pentru FOXL2, WNT4 cresc iar SOX9 este suprimat. În consecință, expunerea la estrogeni poate contribui la scăderea fertilității masculine și la creșterea incidenței tulburărilor de reproducere în ultimele decenii (⁵³). Inhibarea FGF afectează proliferarea celulelor Sertoli, dar nu împiedică diferențierea germinală masculină sau blocarea mitozei. Totuși, inhibiția poate modifica expresia unor gene importante pentru structura și funcția celulelor stem și pentru dezvoltarea tumorilor germinale (⁵⁴). Semnalizarea WNT/ β -catenin favorizează dezvoltarea ovariană la modele murine, iar inhibarea sa este esențială pentru formarea normală a testiculului. Efectele dereglării acestei căi în gonadele fetale umane au fost analizate și prin utilizarea unui model *ex vivo* validat. Activarea WNT/ β -catenin în testiculele fetale a determinat perturbarea gravă a structurii cordoanelor seminifere, a redus proliferarea celulară, a redus expresia markerilor SOX9 și AMH și a determinat pierderea populației de celule germinale. În plus față de afectarea compartimentului germinal și de susținere, activarea WNT/ β -catenin a compromis semnificativ și funcția celulelor Leydig, cu diminuarea secreției de testosteron, androstenedion și INSL3. Inhibarea acestei căi de semnalizare în ovare a avut efecte minore (⁵⁵).

În săptămâna a opta de dezvoltare intrauterină, testiculul în formare prezintă deja structuri morfologice distincte, precum albugineea, cordoanele testiculare, precursorul *rete testis*, precum și ambele perechi de canale genitale (canalele Mülleriene -paramezonefrotice și canalul Wolff - canalul mezonefrotic). La acest stadiu, indiferent de cariotipul embrionului (46,XX sau 46,XY), sunt prezenți precursorii ambelor sisteme de canale genitale interne, ceea ce reflectă potențialul bipotențial al gonadei și al aparatului reproducător. În această etapă de dezvoltare intrauterină, factori care promovează dezvoltarea testiculară (ex. SOX9 și FGF9) sau ovariană (ex. WNT4, RSPO1 și DAX1) se exprimă similar, indiferent dacă embrionul va evolua spre un organism masculin sau feminin (Baetens D, 2019). Fiecare pereche de canale are un potențial unic: canalele Wolff se pot diferenția doar în structuri masculine (ex. epididim, canal deferent, vezicule seminale) iar canalele Müller se vor diferenția exclusiv în structuri feminine (ex. trompe uterine, uter, partea superioară a vaginului). În mod similar, primordiile organelor genitale externe sunt și ele bipotențiale, având capacitatea de a se diferenția fie în penis și scrot, fie în clitoris și labii, în funcție de semnalele hormonale primite.

Perioada fetală este cuprinsă între săptămâna a noua de dezvoltare intrauterină și naștere.

1.2.2. Etapele determinării și diferențierii sexuale

Determinarea sexului (sexul genetic) reprezintă primul eveniment care direcționează dezvoltarea embrionului spre un traseu masculin sau feminin. Acest proces este unic în comparație cu dezvoltarea altor organe, deoarece conduce la formarea a două structuri gonadale complet diferite: testiculul sau ovarul.

La mamifere, determinarea sexului coincide cu diferențierea gonadei bipotențiale. Evoluția acesteia este condiționată de activarea unor gene cheie, localizate în heterozomi. Astfel, prezența cromozomului Y și, implicit, a genei SRY (Sex-determining Region Y) declanșează dezvoltarea testiculului. Perechea de heterozomi XX sau XY determină prima opțiune privind evoluția zigotului spre unul dintre cele două sexe.

După săptămâna a opta de viață postnatală, celulele germinale primordiale (gonocite) sunt înlocuite de spermatogonii întunecate (Ad) și pale (Ap) care reprezintă populația de celule stem spermatogoniale.

În săptămânile opt-nouă de dezvoltare embrionară, din mezenchimul din jurul cordonului se diferențiază celulele interstițiale, din care se vor forma celulele interstițiale Leydig, cu funcție endocrină, steroidogenică (sintetizează hormoni androgeni) esențială pentru diferențierea sexuală masculină. Apariția acestor celule este însoțită de creșterea nivelurilor de testosteron. Dihidrotestosteronul, un metabolit mai activ al testosteronului, a fost identificat în săptămânile 9-13 de dezvoltare intrauterină. Testosteronul și dihidrotestosteronul stimulează dezvoltarea canalelor Wolff, organelor genitale externe și structurilor accesorii masculine (ex. prostată, uretra prostatică, coborârea testiculelor etc). Expresia factorului SF-1 reglează gene precum INSL3 și inițiază steroidogeneza, proces important pentru diferențierea sexuală⁽⁵⁶⁾. Vasul celomic (o arteră specifică testiculelor) contribuie la modelarea cordonului testicular (o caracteristică a diferențierii testiculare timpurii) și, ulterior, la transportul hormonal^(57, 58). Originea celulelor Leydig nu este complet elucidată, dar se presupune că acestea pot deriva din mezonefros, epiteliul celomic, creasta neurală sau primordiile adreno-gonadale (Grinspon RP, 2019,⁵⁹). Rolul biologic al acestor celule este mai bine caracterizat⁽⁶⁰⁾.