



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**“AISLAMIENTO, CULTIVO, CARACTERIZACIÓN Y MADURACIÓN DE
CÉLULAS INDIFERENCIADAS DESDE BIOPSIAS TESTICULARES
HUMANAS”**

Autora:

MARCIA RIBOLDI

Licenciada en Biomedicina

Director:

CARLOS SIMÓN VALLÉS

2012



Prof. Carlos Simón Vallés

Catedrático en Ginecología, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, Director del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) y del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral titulado: **“AISLAMIENTO, CULTIVO, CARACTERIZACIÓN Y MADURACIÓN DE CÉLULAS INDIFERENCIADAS DESDE BIOPSIAS TESTICULARES HUMANAS”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Marcia Riboldi bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 15 de Septiembre de 2011.

Fdo. Prof. Carlos Simón Vallés

AGRADECIMENTOS

En primer lugar, quiero agradecer con todo mi amor a mi Padre y a mi Madre, por darme la oportunidad de ser parte de sus vidas, creciendo y enseñándome todo lo mejor para ser la persona que soy hoy. Además, me permitieron desde el principio, tomar mis propias decisiones y tener mi crecimiento y mi independencia tanto personal como profesional.

Mi Padre, Gilberto Riboldi, la persona más maravillosa que existe en el mundo, a quien yo amo incondicionalmente, el único que sabe todo y que con su silencio y su manera sencilla de ser, me comprende. Por quien yo más he sufrido por la distancia, por la falta de cariño y por las ganas de verlo todos los días, horas y minutos.

Mi Madre, Iara Magdalena Riboldi, a quien yo quiero mucho, tanto, que ha sido muy complicado estar aquí. Quien ha sufrido y pasado por tantas cosas, que es difícil de explicar, porque nunca nadie la comprenderá. Momentos tan difíciles e incomprensibles, que tanto

ella allí, como yo aquí, hemos tenido que ser tan, pero tan fuertes, para poder soportarlos... Quien siempre me ha abierto los ojos y ha hecho que yo, de una manera u otra, aceptara las cosas como tienen que ser.

Gabriel Riboldi, mi hermano, tan diferente de mí. Siempre tranquilo, a la suya, pensando y repensando las cosas. Ha tenido que pasar por n cosas sin estar yo allí para ayudarle, tomando muchas veces las decisiones y haciendo cosas que no le tocaba, superando los peores momentos. Pero ha crecido y mucho, ¡te quiero muchísimo!

A mi Familia, no puedo poner el nombre de todos, pero son tantos... Riboldí's, Magdalena's, Sebben's, Rech's, Onzi's, Brancher's... todos los que me han dado fuerzas para continuar aquí, ayudándome mucho, mucho! Solo puedo dar las gracias y repetir cuantas veces sea necesario, ¡Muchas Gracias de verdad! Vosotros sabéis a qué me refiero.

Dr. Paulo Serafini, uno de los primeros en darme la oportunidad de demostrar la profesional que soy y quiero ser realmente. Quien ha

confiado y creído en mis sueños, abriéndome las puertas profesionales y dándome una oportunidad genial en mi vida. Me ha aceptado en su equipo, en la Huntington, creyendo en mi verdadero potencial. Se ha transformado en un gran amigo y ha sabido cómo descifrar mis caras y miradas. Te lo agradeceré hoy y siempre con mi total amistad y confianza, ¡Muchas gracias Tío!

José Roberto Alegretti, o Beto, gracias por ser mi primer amigo paulista y el mejor, por enseñarme todo, todo lo que sabes y un poco más de la práctica y de la vida. Has estado conmigo un año, a mi lado casi que 12 horas al día o más, pasamos por innumerables cosas y he estado presente en casi los ¡1.000 casos de 2007! Gracias por darme incentivos y estar aquí siempre presente, hasta hoy...

Péricles Hassun, o Peri, una persona especial que siempre me ha dado mucho entusiasmo y también ha sido uno de los ejemplos a seguir. Gracias, ¡muchas gracias por nuestra amistad!

Prof. Carlos Simón, mi jefito, “mi padre” y uno de los mejores amigos

en España. La otra persona fundamental en mi vida, quien también me ha abierto las puertas, dándome la posibilidad de comenzar mi carrera investigadora. Me ha dado la posibilidad de hacer parte de un poquito de la historia de la Fundación y Clínica IVI, así como del CIPF. Ha creído y confiado en mí desde el principio y además me ha comprendido en todos los momentos difíciles que he pasado lejos de casa. ¡Doctor! Millones de gracias, tú sabes cuánto me ha gustado estar aquí y ser durante más de 4 años parte de tu equipo. No tienes idea de cuánto será eso de importante de aquí en adelante en mi vida. Siempre, siempre estaré agradecida por ser mi ejemplo de dedicación y ambición.

Daniel Giuliatto, una persona muy, muy especial en mi vida y que con certeza ha sido esencial. Destino... puede ser, porque hemos tenido que cruzar el océano para encontrarnos. Compañero, amigo, oyente... son tantos los adjetivos para esa persona que me ha ayudado de mil maneras distintas a crecer y aprender más y más, creyendo y confiando en mí. Han sido 4 años de mucho amor y amistad. Juntos nos complementamos. Gracias por todo...

Eva Sánchez, la Eva Madre o mejor la Súper Eva... la primera persona que me ha enseñado lo que era una célula madre, que me ha hecho dar los primeros pasos dentro del laboratorio. Tan loca, tan inocente y lo más importante, amiga. ¡Eeeevaaa! Ha sido un placer.

Eva Gómez, la Eva Pequeña, Evita y ahora también madre... no tengo palabras para todo lo que has hecho por mí. Has sido mi mejor amiga, mi hermana, mi confidente y hasta mi "madre". Te quiero y no tienes idea de cuánto. Y no sabes cómo serán mis días sin ti. Ya ha sido difícil esos meses lejos.... Gracias, millones de veces gracias y perdona por molestarte tanto... y sabes que yo siempre seré la tía brasileña de Marquitos.

Maria Eugenia, la Póo... ayayay... por dónde empiezo. Otra persona que se ha transformado en alguien muy especial. La persona que me ha hecho ver muchas cosas de otra forma, que me enseñó que no sólo a mí me pasaban las cosas. La amiga, consejera, oyente, la mamá y además la "médica" jejejeje... Póo, tú sabes cómo ha sido de difícil,

pero tú también sabes que mi sitio es en Brasil, né! Te quiero mucho, mucho. Muchas y muchas gracias por todo, de verdad.

Vero, ha sido un placer trabajar contigo. Gracias por todo lo que me has enseñado molecularmente y por todas las informaciones que nos traías, jejeje.

José Vicente, empezamos casi juntos y en la misma línea, un tiempo después nos separamos, pero en realidad continuábamos en la misma batalla... ¡la Tesis! Has sido uno de los primeros en el lab con quien mantuve una conversación y con el tiempo tu amistad. Te deseo toda la suerte del mundo. Y gracias por todo lo que hemos pasado juntos, ¡han sido unos buenos 4 años!

Irene, muchas gracias por haberme dado la primera oportunidad. Ayudarte en tu proyecto fue para mí el principio de todo. También muchas y muchas gracias por las conversaciones, ideas y por último muchas gracias por las correcciones en la tesis.

Amparo Galán, gracias por todo lo que me has ayudado y enseñado... he podido aprender muchas cosas contigo. Además, muchas gracias, también, por todo el apoyo en los momentos difíciles...

Anabel, de verdad que ha sido un placer enorme conocerte. Me ha encantado tu "astral" y tu enorme energía para todo. ¡Me has dado envidia muchas veces! Gracias por ser mi amiga y compañera. Besos y más besos....

Cristóbal, ¡el mejor Doctorcito! Corazón, te quiero tanto... gracias por haber sido siempre mi amigo y haberme escuchado una, dos o más veces... gracias por preocuparte y por estar presente en mi vida estos años.

Sonia, ¡qué bien lo hemos pasado juntas! No sé cómo y tampoco el por qué, pero siempre nos hemos llevado súper bien. ¿Tal vez por parecernos tanto? ¿O por tener muchos objetivos en común? Gracias por tu amistad, tú ayuda y todo lo demás. Sabes que no es necesario hablar mucho, que nosotras solo mirándonos ya captamos las cosas :)

Aymara, ¡chica! ¡Qué bueno ha sido estar contigo estos años! Lo he pasado fenomenal Pero de verdad... ¡cálmate! Que todo terminará bien... de verdad. Soy la mejor persona para decirte eso. Solo yo sé cuánto me he estresado y he tenido miedo al principio, pero luego todo cambia.

Diana, ¡estoy encantada contigo! Una persona tan buena, sin maldad, sin dudar del enemigo. Quién pudiera ser así también... Gracias por todo lo que me has ayudado y compartido en estos años. ¡Gracias por haber estado tan presente en mi vida!

Antonio, ¡qué placer ha sido conocerte! Una persona admirable, que me ha dado mucha inspiración... en la vida y sin duda en la tesis.

Claudia, que todo te vaya muy bien. Encantada por pasar poco, pero tiempo suficiente... ha sido de verdad un placer.

Amparo, ¡la Filipina! De verdad me ha encantado conocerte. Tantas

risas, tantas cosas en común. Tantas verdades que jamás hemos podido disimular o esconderlas...

María y Jaime ha sido un placer conocerlos.... Lo malo es que ha sido tan poco tiempo...

Emily, ¡ayyy amiga! ¡Cuánto siento el poco tiempo que hemos podido pasar juntas! Pero también, el tiempo ha volado después de conocernos y hacernos amigas. ¡Y qué amigas eh!... Gracias por haber estado conmigo en tiempos en los que nada ha sido fácil. Por las risas, las "happy hours" las fiestas... En fin, por todo lo que ahora veo que ha sido poco y corto. Te quiero... y también sé que pronto nos veremos, ¿no? ¡En la ciudad maravillosa! Jejejeje.

A todos los que conocí en el CIPF: Iván, Slaven, Vicente, Pilar, Vanesa, Martina, Cris, Patri (gracias por las 1001 informaciones). Inma, ¡eres un ángel!, no hay palabras para la corrección gramatical en menos de 24h así como por todo lo demás. Millones de Gracias. Ha sido un enorme placer. ¡De verdad!

A todos los compañeros de la Fundación IVI: Sebas, Alicia, Tamara, Hortensia, Paco, Carlos, Raúl, Juanma, Isabel, Carmen.

Felip, sin palabras, ¡es imposible recompensarte! Gracias y mil veces gracias por el americano. La única cosa que se me ocurre es que la próxima vez que cruces el charco... ¡nos vemos en Brasil!

Jaime, por su gran paciencia y ayuda siempre que necesitaba hablar con el Dr. y solucionar algunos pequeños problemitas.

Marcos, gracias por todo el papeleo y atención necesaria para solucionar toda la burocracia de éste país.

Dr. Manuel Gil-Salom, por ser mi urólogo preferido, proporcionarme siempre las muestras de sus pacientes y ser la principal persona que ha “permitido” que éste estudio fuese adelante.... Por avisarme y tener interés en todas mis ideas y proyectos, también por tener paciencia conmigo y terminar siendo un amigo, al cual quiero y tengo mucho cariño y afecto. Hasta hoy no me lo creo... las cosas incomprensibles de la vida...

Al Dr. Jabaloyas, que ha continuado con el trabajo de Dr. Gil concediéndome las biopsias y permitiendo la finalización de mi tesis doctoral.

A los donantes y pacientes que han participado en este estudio con sus biopsias testiculares.

A todos los que trabajan en el FIV: Rafa y sus compañeros por las numerosas biopsias que ha sido posible dejarme.

Al departamento de Citometría del CIPF: Alicia y Domingo muchas y muchas gracias por todos los "Sorter" que hemos hecho, perdonadme por los retrasos, cambios e imprevistos...

Mario, por todo que me has ayudado con la ME, ¡perdona por mis momentos de histeria! ¡Y lo urgente que era todo! Gracias.

Al departamento de DPG del IVI: M^a Carmen Rubio, Nasser, Vane y Emi por tener tanta y tanta paciencia conmigo. Y perdonad por la

pelea del principio, cuando yo “hurté” una biopsia... Jejejeje. ¡Gracias por haberme enseñado tantas cosas! En realidad por todo...

A Marcos Meseguer, gracias por la disposición inmediata con los intentos de estadísticas.

A mis amigos brasileños, que he tenido el placer de conocer aquí, al otro lado del Atlántico: Luís Felipe, Lala, Yana, Mithielli, Vini, Fortuna, Tobias, Laércio, Dani, Telma...

Rizk, mi mejor amigo el marroquí casi brasileño, mi otro “Padre”, amigo, hermano... quien siempre me ha ayudado una, dos, cien veces..., estando disponible para lo que viniera y fuera a cualquier día u hora. ¡Ah, y jamás me olvidaré de sus historias de cambiarme por camellos y de tenerme como una de las esposas! Jejejeje. Bjaozao!!!!

Y los que están en Brasil, que es imposible nombrar a todos. De Caxias, Porto, Xangri y Sao Paulo... siempre os he echado a todos de menos, y mucho....

A mi psicóloga, la Dra.Pilar Dolz quien he conocido y me ha encantado. La persona que me ayudó, y mucho, cuando he estado a punto de explotar, Jejejeje. ¡Gracias por aguantarme!.

A mi ginecólogo, Dr. Antón Millet. Nunca me olvidaré de una de nuestras conversaciones... claro, con la sala de consultas explotando de gente... “¡Marcia! ¿Qué haces en España? ¡Teniendo aquel país maravilloso!” Entonces Dr., ahora vuelvo de verdad a mi país maravilloso con todos los míos... Me ha encantado conocerte estos años. Y gracias por cuidarme tan bien.

Al Dr. Santiago Grisolíá, por medio de la Generalitat Valenciana, por proporcionarme a través de su programa la beca de formación predoctoral con la que he podido realizar mi doctorado.

Perdonarme por algo...

Y Muchísimas Gracias a todos!

Con Cariño,

Marcia Riboldi

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el Banco Nacional de Líneas celulares del *Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF)* de Valencia. Las muestras fueron obtenidas en el *Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI Valencia)*. Para la realización de la presente Tesis doctoral se concedieron becas desde *Fundación IVI-Valencia* y *Cátedra Santiago Grisolia*, así como una ayuda *Merck Serono* de Investigación 2010 por la *Fundación Salud 2000*.

LISTA DE ABREVIATURAS

2X SSC: Citrato Sódico Salino

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMH: Anti-Mullerian Hormone (hormona anti-mulleriana)

AO: Azoospermia Obstructiva

AR: Retinoic Acid (Ácido Retinoico)

ARN: Ácido Ribonucleico

AS: Azoospermia Secretora

ASC: Adult Stem Cell (Célula Madre Adulta)

bFGF: basic Fibroblast Growth Factor (Factor básico de crecimiento de fibroblastos)

BLIMP1/PRDM1: B lymphocyte Maturation Protein 1/ PR Domain zinc finger protein 1

BMP: Bone Morphogenetic Protein (Proteína morfogenética de hueso)

BSA: Bovine Serum Albumine (Albumina Sérica Bovina)

BT: Biopsia testicular

cDNA: complementary DNA (DNA complementario)

CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe

D: Diploteno

DAPI: 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole (4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato)

DAZL: Deleted in Azoospermia Like

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMC1: Dosage supressor of MCK1 homologue

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: nutrient mixture F-12

DMEM: Dulbecco's Modified Essential Medium

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: DesoxiriboNucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

EBs: Embryoid body (Cuerpos Embrioides)

EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid (Ácido etilendiaminotetraacético)

ESC: Embryonic Stem Cell (Célula Madre Embrionaria)

EtOH: Etanol

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter (Separación celular mediante fluorescencia emitida)

FBS: Suero Bovino Fetal

FISH: Fluorescent In Situ Hybridization (Hibridación in situ del DNA fluorescente)

FIV: Fecundación *in vitro*

FSH: Follicle Stimulating Hormone (Hormona estimuladora de folículos)

FSK: Human foreskin fibroblast (Fibroblasto humano de piel de prepucio)

GAPDH: GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
(Gliceraldehido 3-fosfato des-hidrogenasa)

GDNF: Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales

HBSS: Hanks Balanced Salt Solution

ICSI: Intra-Cellular Sperm Injection (Inyección intra-citoplasmática)

IVF: *In vitro* FERTILIZATION (Fertilización *in vitro*)

IVI: Instituto Valenciano de Infertilidad

KCl: Cloruro de Potasio

Ko-DMEM: Knockout Dulbecco's Modified Eagle's Medium

L: Leptoteno

LIF: Factor Inhibidor de Leucemia

M1: Medio de cultivo 1

M2: Medio de cultivo 2

M3: Medio de cultivo 3

MCI: Masa Celular Interna

MEF: Mouse Embryonic Fibroblast (Fibroblasto embrionario de ratón)

NEAA: Non-Essential AminoAcids (Aminoácidos no esenciales)

OCT4: Octamer 4

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: Paquitenio

PB: Phosphate Buffered

PBS: Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PE: PhycoErytrin (Ficoeritrina)

PFA: Paraformaldehído

PGC: Primordial Germ Cell (Célula Germinal Primordial)

PI: Propidium Iodide (Yoduro de Propidio)

PIWIL: P-element induced wimpy testis Like

Prm1: Protamin 1

qPCR: quantitative PCR (PCR cuantitativa)

RA: Reproducción Asistida

RFP: Red Fluorescent Protein (Proteína roja fluorescente)

RNA: RiboNucleic Acid (Ácido ribonucleico)

RPL19: Ribosomal Protein L19 (Proteína ribosomal L19)

RT: Room Temperature (Temperatura Ambiente)

SBF: Suero Bovino Fetal

SPF: Specific Pathogen Free Organism

SCID: Ratones con Inmunodeficiencia Severa Combinada

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences (paquete estadístico para ciencias sociales)

SSC: Spermatogonial Stem Cell (Célula Madre de Espermatogonia)

SSEA-1: Stage Specific Embryonic Antigen 1

Taq: Thermus aquaticus

TBS: Tris Buffered Saline (Tampón Tris salino)

Tm: Melting Temperature (Temperatura de fusión)

TSR8: Control positivo interno de cuantificación (Control template)

TTT: Tratamiento

Z: Zigoteno

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN

1. Establecimiento, migración y colonización de las células germinales primordiales
2. Formación de la línea germinal masculina
3. La gónada masculina
4. Espermatogénesis
 - 4.1 Fase Proliferativa
 - 4.2 Meiosis
 - 4.3 Espermiogénesis
5. Esteroidogénesis
6. Spermatogonial Stem Cells (SSC)
 - 6.1 . Identificación y aislamiento de SSC
 - 6.2 . Protocolos para el cultivo celular de SSC
 - 6.3 . Trasplante de SSC
 - 6.4 . Espermatogénesis *in vitro*

II. HIPÓTESIS

III. OBJETIVOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y muestras
2. Disgregación y cultivo celular de las biopsias testiculares
3. Cultivo de células de Sertoli
 - 3.1 Transfección de las células de Sertoli con la proteína roja fluorescente (RFP - red fluorescente protein)
4. Aislamiento y cultivo de las Spermatogonia Stem Cell (SSC)
 - 4.1 Condiciones de cultivo
5. Co-cultivo de células CD49f+ con células de Sertoli para maduración *in vitro*
6. Caracterización de las células aisladas
 - 6.1 Caracterización molecular
 - 6.2 Análisis cromosómico
 - 6.3 Inmunocitoquímica
 - 6.4 Tinción de lípidos (Oil Red)

6.5 Diferenciación *in vitro*

6.6 Diferenciación *in vivo*

6.7 Microscopía Electrónica (ME)

7. Análisis estadístico de los datos obtenidos

8. Esquemática de los Materiales y Métodos

V. RESULTADOS

1. Disgregación celular de las biopsias testiculares

2. Aislamiento de las células CD49f+

3. Protocolos de cultivo y caracterización de células CD49f+

3.1 Protocolo de Conrad et al (M1)

3.2 Protocolos modificados (M2 y M3)

4. Co-cultivo de las células CD49f+ con células de Sertoli

4.1 Caracterización de la línea de células de Sertoli

4.2 Transfección de las células de Sertoli con RFP

4.3 Maduración *in vitro*

- VI. DISCUSIÓN
- VII. CONCLUSIONES
- VIII. BIBLIOGRAFÍA
- IX. ANEXO

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Establecimiento, migración y colonización de las células germinales primordiales.

En el ser humano y en los mamíferos en general, la línea germinal proviene de una pequeña población de células pluripotentes que se segrega del resto durante los primeros estadios de la embriogénesis, y conforma lo que se denominan las “células germinales primordiales” (del inglés Primordial Germ Cells, PGCs). Las PGCs son, por tanto, las primeras células germinales inmaduras con un alto grado de pluripotencialidad.

La primera población de PGCs, en embriones humanos, se localiza extra-embriónariamente en el saco vitelino alrededor de las semanas 2 a 3 del desarrollo embrionario (**Figura 1**). En ratón, las PGCs se originan en el epiblasto proximal a partir de una pequeña población de células localizada en la base del alantoides en el día E7.5 de desarrollo embrionario (Ginsburg, Snow et al. 1990). Los primeros inductores son los factores BMP4 y BMP8 (del inglés Bone Morphogenetic Proteins) procedentes del ectodermo extra-embriónico adyacente (Lawson, Dunn et al. 1999, Ying, Liu et al. 2000, Fujiwara, Dunn et al. 2001, Ying, Qi et al. 2001, Saitou, Barton et al. 2002). En respuesta a esta inducción, éstas células comienzan a expresar *BLIMP1* (también conocido como *PRDM1* por PR Domain

zinc finger protein 1), el cual es un factor de transcripción encargado de silenciar su programa somático y así activar su destino germinal (Ohinata, Payer et al. 2005, Vincent, Dunn et al. 2005). Al mismo tiempo, estas PGCs empiezan a expresar los genes *FRAGILIS* (también conocido como *IFITM1*, por InterFeron Induced TransMembrane protein 1) y *STELLA* (también conocido como *DPPA3* por Developmental PluriPotency Associated 3), los cuales se encargan de determinar su carácter germinal (Saitou, Barton et al. 2002, Lange, Saitou et al. 2003). Además, las PGCs son la única población celular derivada del epiblasto que retiene la expresión de marcadores de pluripotencia como *OCT4* (también conocido como *POU5F1* por POU class 5 homeobox 1), *NANOG*, y la actividad fosfatasa alcalina tras el proceso de gastrulación (Ginsburg, Snow et al. 1990, Scholer, Dressler et al. 1990, Pesce, Wang et al. 1998, Mitsui, Tokuzawa et al. 2003).

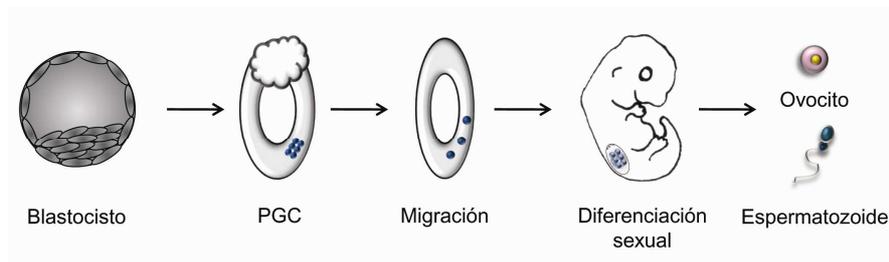


Figura 1. Origen de las Células Germinales (modificada Riboldi *et al.*, 2012a).

Tras su formación extra-embrionaria en el saco vitelino del epiblasto proximal, las PGCs comienzan a dividirse activamente mientras migran a través del endodermo subyacente (que originará el

intestino grueso) hacia las crestas gonadales en formación (Clark and Eddy 1975, Godin, Wylie et al. 1990, Gomperts, Garcia-Castro et al. 1994, Lawson and Hage 1994, Molyneaux, Stallock et al. 2001). Ésta migración tiene lugar entre las semanas 4 y 6 del desarrollo embrionario humano (Fujimoto, Miyayama et al. 1977, Goto, Adjaye et al. 1999), mientras que en el ratón ocurre entre los días E8.5 y E12.5 (Wylie, Stott et al. 1986). Durante esta fase migratoria, las PGCs expresan altos niveles del receptor de membrana c-KIT, el cual parece estar implicado en su migración y supervivencia (Matsui, Zsebo et al. 1990) mediante la activación de cascadas de señalización cuyo efector intermediario suele ser PI3K (del inglés Phosphatidylinositol 3 Kinase).

Tras su migración a lo largo del embrión, las PGCs colonizan las crestas gonadales en formación, lo cual induce un profundo cambio en su programa de expresión genética y epigenética. En este momento, las PGCs pasan a llamarse gonocitos y adquieren una morfología redondeada cuya principal característica es un reducido ratio citoplasma:núcleo (Donovan, Stott et al. 1986). Además de estos cambios morfológicos, los gonocitos inician la expresión de diversos genes cruciales para su maduración. Entre estos genes, los más destacables codifican para diversas proteínas de unión al RNA altamente conservadas en la línea germinal de los metazoos a lo largo de la evolución, como *DAZL* (del inglés Deleted in Azoospermia Like) y *VASA* (proteína codificada por el gen *DDX4*). La función de *DAZL* parece ser esencial para la formación, supervivencia y

maduración de las células germinales, ya que su ablación o silenciamiento, se traduce en la ausencia total de línea germinal en ambos sexos en el ratón (Saunders, Turner et al. 2003). VASA (proteína codificada por el gen *DDX4*), posee función helicasa RNA ATP-dependiente, y también parece ser esencial para la supervivencia y maduración de la línea germinal en todos los metazoos (Castrillon, Quade et al. 2000, Tanaka, Toyooka et al. 2000, Noce, Okamoto-Ito et al. 2001) (**Figura 2**).

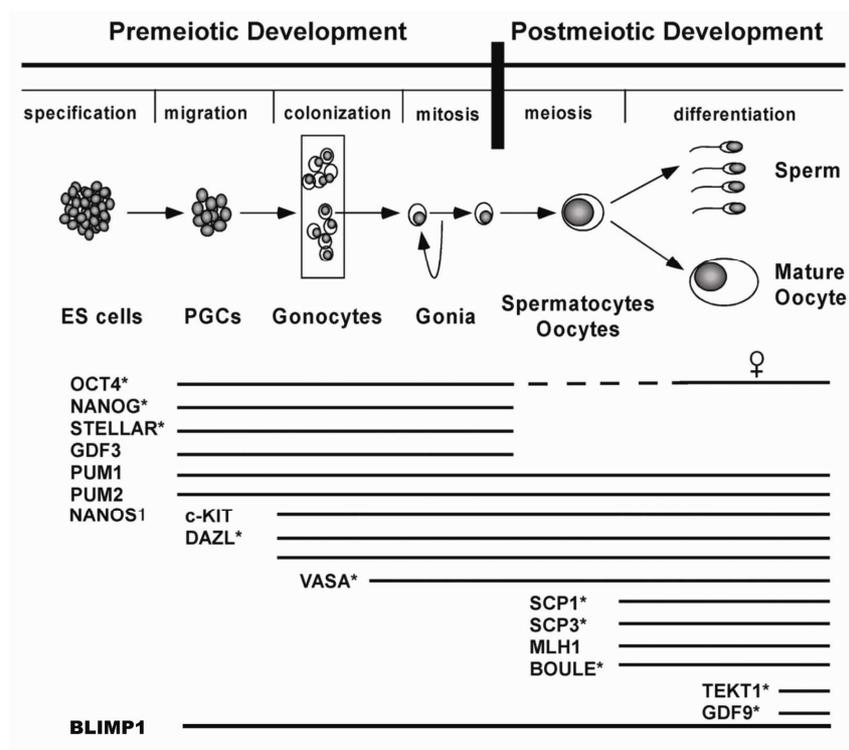


Figura 2. Representación esquemática de las etapas del desarrollo de la línea germinal humana (modificada de (Clark, Bodnar et al. 2004)).

2. Formación de la línea germinal masculina

La determinación sexual de las células germinales que han colonizado las crestas gonadales depende del nicho gonadal (Byskov 1986). En ausencia de expresión del gen *SRY* por parte de las células de soporte del nicho gonadal bipotencial, el programa por defecto de las células germinales es el de formar oogonias o células germinales femeninas. Es, por tanto, la expresión del gen *SRY* por parte de las células XY del nicho, la señal determinante para la diferenciación sexual masculina de la gónada y, por tanto, la diferenciación de los gonocitos a espermatogonias. Entre otras dianas, *SRY* activa la expresión de *SOX9* (del inglés *SRY*-box 9), el cual induce la diferenciación de las células de Sertoli y la conversión de la cresta gonadal asexual en testículos, así como la inducción de conducto secretor y glándulas seminales mediante la proliferación de los conductos de Wolff y la inhibición de los de Muller en respuesta a la hormona anti-Mulleriana (AMH, del inglés Anti-Mullerian Hormone) secretada por las células de Sertoli (Burgoyne 1988, McLaren 1988, Koopman, Munsterberg et al. 1990, Sinclair, Berta et al. 1990).

En el varón, los gonocitos se situarán en la membrana basal de los túbulos seminíferos y mantendrán su capacidad de proliferación bajo la influencia de las células de Sertoli (Grootegoed, Siep et al. 2000, Print and Loveland 2000). Allí se mantienen en la fase G_0 de la mitosis, de modo que permanecen inactivas hasta después del nacimiento, momento en que retoman el ciclo celular y se

diferencian en espermatogonias (Dunkel, Taskinen et al. 1997, Print and Loveland 2000).

En humanos, este proceso de diferenciación tiene lugar desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad (Dunkel, Hirvonen et al. 1997, Print and Loveland 2000). A partir de este momento, las células germinales o espermatogonias permanecen latentes hasta que inician la meiosis después de la puberta (Dunkel, Hirvonen et al. 1997, Chemes 2001) (**Figura 3**).

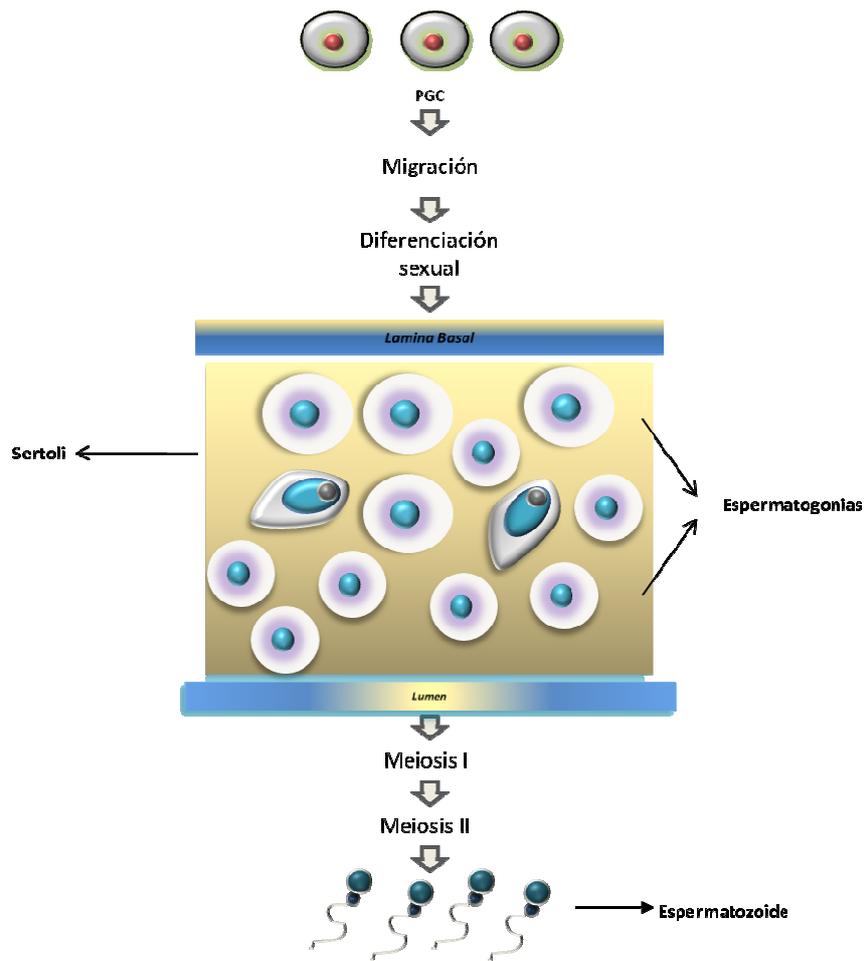


Figura 3. Desarrollo de la Línea Germinal Masculina (modificada Riboldi *et al.*, 2012a).

3. gónada masculina

El aparato sexual masculino está formado por los testículos, las vías espermáticas, las glándulas sexuales anexas (vesícula seminal, próstata y glándulas bulbouretrales) y el pene. Las principales

funciones del testículo son la espermatogénesis y la esteroidogénesis.

Los testículos se desarrollan (séptima semana del desarrollo fetal) en la pared posterior del abdomen y luego descienden hasta el escroto. El sexo gonadal está determinado por el gen SRY junto con la proteína factor determinante testicular (TDF), que se une al DNA codificando el gen y causando la diferenciación testicular (Ross y Pawlina. 2008). Los testículos están formados por capas: el mesodermo intermedio que forma las crestas urogenitales, el epitelio mesodérmico que tapiza las crestas urogenitales y las células germinativas primordiales que migran desde el saco vitelino hacia las gónadas en desarrollo, donde se dividen y se diferencian a espermatogonias (Ross y Pawlina. 2008). Los testículos albergados en la bolsa escrotal, están cubiertos por una cápsula de tejido conjuntivo denso: la túnica albugínea. Cada testículo está dividido en alrededor de unos 250 lóbulos, cada uno de los cuales está compuesto por 1 a 4 túbulos seminíferos en los que se produce los espermatozoides. Estos túbulos forman un sistema de conductos con una longitud global de 2 a 2.5m. En su interior se desarrolla el proceso de espermatogénesis. Además, hay un estroma de tejido conjuntivo en el que se encuentran las células intersticiales o células de Leydig.

A partir de la pubertad, los túbulos seminíferos están compuestos por 2 tipos de células: las germinales (espermatogonias) y las células de Sertoli. Éstas, son células epiteliales diploides localizadas en el

interior de los túbulos que actúan como soporte, forman uniones firmes tipo “tight junctions” que impiden el paso de moléculas grandes, hormonas esteroideas e iones al espacio luminal. Estas uniones forman la base estructural de la barrera hemato-testicular que crea un ambiente endocrino-metabólico especial para que se produzca la espermatogénesis. Las células de Sertoli poseen receptores para la hormona folículo estimulante (FSH) y la testosterona (Sang, Dym et al. 1992). Además, producen una serie de compuestos como la inhibina, activina, y transferrina, entre otros. Una lámina basal separa el epitelio seminífero del tejido conectivo circundante donde se encuentran las células de Leydig. Estas se encuentran situadas en el espacio peritubular (Payne, McKay et al. 1996), agrupadas preferentemente alrededor de los vasos, y secretan la testosterona, hormona fundamental para mantener la espermatogénesis y proporcionar las características sexuales secundarias masculinas (Holstein, Schulze et al. 2003) (**Figura 4**).

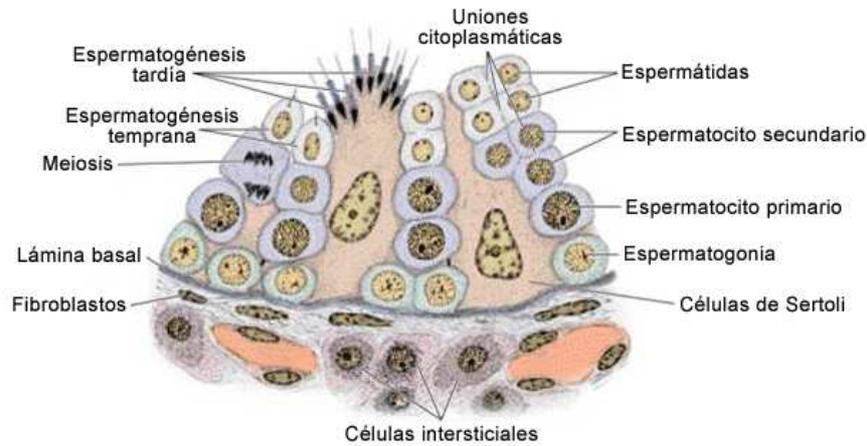


Figura 4. Composición del Túbulo Seminífero (modificada (Holstein, Schulze et al. 2003).

4. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso biológico muy complejo que requiere la diferenciación continua y la renovación germinal de las células masculinas. Es el proceso por el cual las células se transforman produciendo células germinales haploides masculinas a partir de las células madre de espermatogonias, células diploides (Hess y de Franca. 2009). Una vez que las PGCs llegan a la cresta gonadal de un embrión masculino, se incorporan en los cordones sexuales, permaneciendo allí hasta la pubertad, momento en cual empieza la formación de los túbulos seminíferos y el epitelio se diferencia en las células de Sertoli (Zhao, Deng et al. 1996). Este proceso comienza un poco antes de la pubertad bajo la influencia de

las concentraciones cada vez mayores de gonadotrofinas hipofisarias y se prolonga durante toda la vida del varón (Parvinen 1982, Kerr 1992, van Pelt, van Dissel-Emiliani et al. 1995, de Rooij 1998, Griswold 1998, de Rooij 2001). Las sucesivas divisiones mitóticas de la espermatogénesis y de las células madre de espermatogonias son conocidas como la fase proliferativa, por la cual se asegura la renovación celular. Eso implica dos destinos distintos de una célula germinal: mitosis (duplicación) o meiosis (reducción y diferenciación) (Sutovsky y Manandhar., 2006). Debido a eso, la espermatogénesis se divide en tres fases principales: proliferativa, meiosis y espermiogénesis, pasos consecutivos que se inician con la división de las espermatogonias y finalizan con la formación de espermatozoides maduros (**Figura 5**).

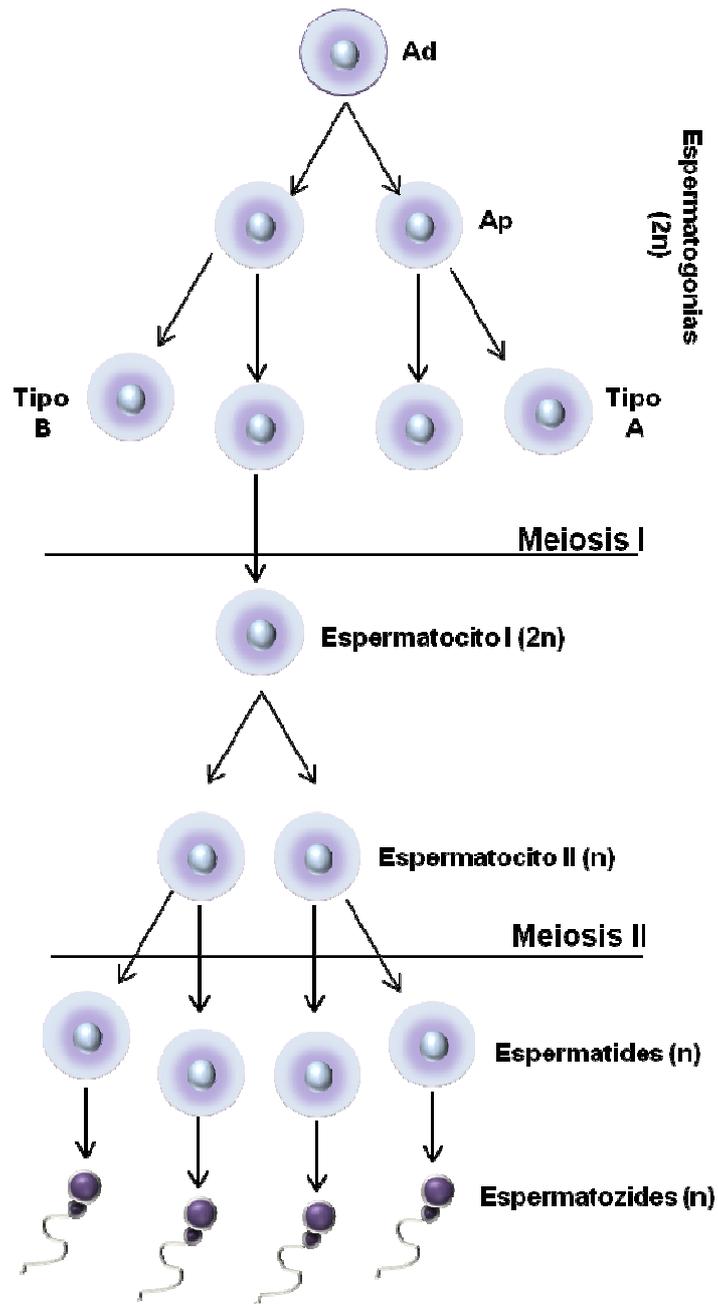


Figura 5. Fases de la espermatogénesis.

4.1 Fase Proliferativa: La producción de espermatozoides depende del tamaño de la población de células iniciales conocidas como espermatogonias. En el testículo humano, se identifican 3 tipos de espermatogonias, que se clasifican como: Tipo A pale (Ap), Tipo A dark (Ad) y Tipo B. El Tipo Ap tiene el núcleo redondo, la periferia llena de nucleolos y las mitocondrias agregadas y localizadas perinuclearmente. El factor principal que distingue el Tipo Ad del Tipo Ap es la presencia en el núcleo de una vacuola llena de gránulos de cromatina. Al contrario, el Tipo B tiene contacto con la membrana basal de los túbulos seminíferos, presenta localización periférica de la cromatina, contiene numerosos nucléolos no compactos y la presencia dispersa de mitocondrias. Además, el Tipo B comienza el proceso de la meiosis, pero sin división celular, manteniéndose unidas por medio de puentes citoplasmáticos, representando las citocinesis incompletas (Heller and Clermont 1964) de Kretser, 2000).

4.2 Meiosis: la entrada de las células del Tipo B en el proceso de la meiosis, está marcada a través de la disminución del contacto con la membrana basal de los túbulos seminíferos y con la aparición de los cromosomas. Durante la primera división meiótica, las células del Tipo B se convierten en

espermaticos primarios, sufren numerosas divisiones originando subetapas que representan la fase prolongada de la profase. Esas fases de la Profase I son: Leptoteno, Zigoteno, Paquiteno y Diploteno hasta llegar en espermaticito secundario. Después de aproximadamente 6 horas (en humanos) sufren una nueva división formando las espermátidas. Esas dos divisiones resultan en la conversión de células diploides a células haploides, con solo 23 cromosomas (Heller and Clermont 1964) de Kretser et al., 1998).

Fases de la Meiosis (Gangane. 2008, Starr y McMillan., 2010):

I. **Meiosis I:** está subdividida en cuatro fases (**Figura 6**).

a) **Profase I:** es la etapa más larga y más compleja del proceso. Los cromosomas homólogos forman pares ocurriendo entrecruzamiento cromosómico e intercambio del material genético entre ellos. Esa fase se divide en 5 subetapas: (**Figura 6**)

a1) **Leptoteno:** los cromosomas se hacen visibles, son como filamentos muy delgados y enmarañados. Además, las cromátidas hermanas se encuentran íntimamente alineadas aunque todavía no son visibles al microscopio óptico

(alargamiento de los cromosomas (SCP3: naranja) y condensación de la cromatina (CREST: azul) (2n)) (**Figura 6.1**).

a2) **Zigoteno:** los cromosomas homólogos comienzan a acercarse hasta quedar estrictamente pareados (sinapsis) al largo de toda su extensión (**Figura 6.2**).

a3) **Paquiteno:** los cromosomas aparecen enrollados, el apareamiento cromosómico queda completo y cada par de cromosomas homólogos dan como resultado una tétrada o bivalente, formada por cuatro cromátidas. En éste punto ocurre el *crossing-over* o entrecruzamiento de los cromosomas homólogos, en el cual las cromátidas homólogas no hermanas intercambian material genético (**Figura 6.3**).

a4) **Diploteno:** en ésta fase continúa la condensación cromosómica hasta la formación de las cromátidas. Aunque los cromosomas homólogos están aislados, los centrómeros todavía permanecen intactos, lo que mantiene las cromátidas hermanas conectadas a través del quiasma (puntos de cruzamiento) (**Figura 6.4 y 6.5**).

a5) **Diacinesis:** los cromosomas llegan a la condensación máxima.

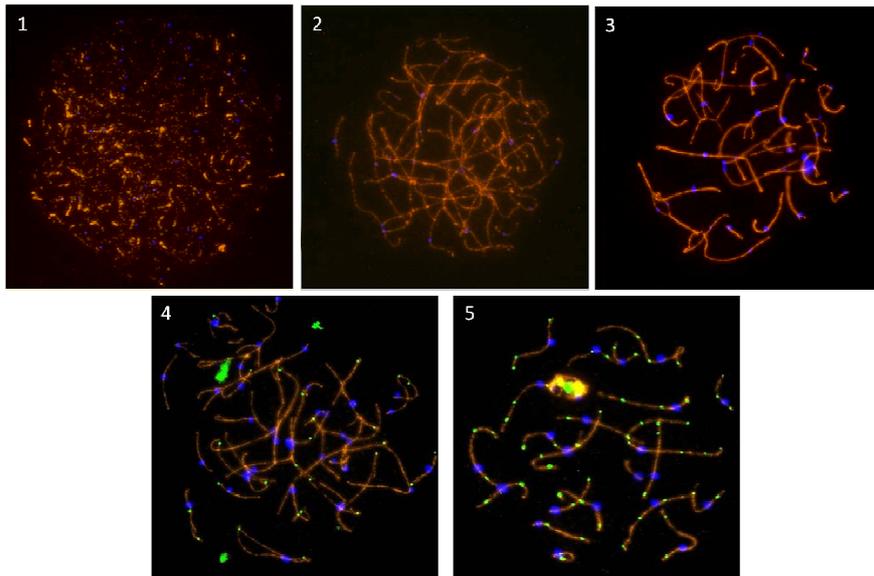


Figura 6. Fotos de microscopía de fluorescencia: Fases de la Profase I - 1. Leptoteno: SCP3 (naranja) y CREST (azul), 2. Zigoteno: SCP3 (naranja) y CREST (azul), 3. Paquiteno: SCP3 (naranja), MLH1 (verde) y CREST (azul), 4,5. Diploteno: SCP3 (naranja), MLH1 (verde) y CREST (azul) (creación propia).

b) **Metafase I:** Desaparece la membrana nuclear. El huso cromático está formado, los cromosomas ya apareados se alinean en el plano ecuatorial y sus centrómeros están orientados en dirección a los polos.

c) **Anafase I:** separación de los quiasmas y sus respectivos centrómeros con las cromátidas hermanas fijadas en dirección a los polos opuestos de la célula. Con eso, los quiasmas se distribuyen independientemente unos de los otros, separando de esa manera los conjuntos maternos y paternos aleatoriamente.

d) **Telofase I:** los dos conjuntos haploides de cromosomas se agrupan en los polos opuestos de la célula.

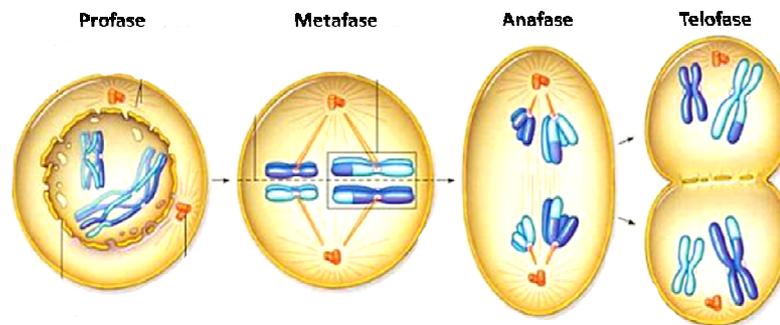


Figura 7. Diagrama de las Fases de la Meiosis (Profase, Metafase, Anafase, Telofase) (Starr y McMillan., 2010).

II. **Meiosis II:** tiene inicio en las células resultantes de la Telofase I.

a) **Profase II:** después de la formación del huso, comienza a desaparecer la membrana nuclear.

b) **Metafase II:** los 23 cromosomas subdivididos en 2 cromátidas hermanas unidas por un centrómero todavía están pegadas al huso.

c) **Anafase II:** Las cromátidas se separan y se desplazan hacia polos opuestos.

d) **Telofase II:** formación de una membrana nuclear alrededor de cada conjunto de cromátidas.

4.3 Espermiogénesis: es el proceso de transformación celular de las espermatidas en espermatozoides, que son células especializadas, para ejercer su función de motilidad e interacción con el ovocito. Dentro de los cambios más importantes en esta fase se encuentran:

1º) El desarrollo del acrosoma, que deriva del aparato de Golgi y contiene las enzimas necesarias para poder penetrar en la zona pelúcida del ovocito.

2º) La aparición del flagelo, que se origina a partir de los centriolos y tiene una función energética gracias a la presencia de un número importante de mitocondrias que se encuentran rodeando el axonema (pieza media).

3º) La reorganización del citoplasma, liberando el excedente como un cuerpo residual fagocitado por las células de Sertoli; y, por último, los cambios en la forma, contenido (debido a las modificaciones químicas en su DNA y proteínas nucleares) y posición del núcleo celular que migra de su posición central a la periferia celular (Heller and Clermont 1964).

5. Esteroidogénesis

El tejido intersticial que se localiza entre los túbulos seminíferos está

compuesto por células de Leydig, macrófagos, tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. Este compartimento tiene como función la esteroidogénesis, es decir, la síntesis y secreción de hormonas sexuales, en concreto por las células de Leydig, que son la fuente primaria de andrógenos. La hormona luteinizante (LH) producida por la glándula pituitaria anterior es requerida para mantener la estructura y función de las células de Leydig. Aunque ambos eventos (espermatogénesis y esteroidogénesis) suceden en compartimentos distintos, es crucial la interacción entre ambos para poder conseguir una producción de espermatozoides adecuada en calidad y cantidad (Remohí et al., 2002).

6. Spermatogonial Stem Cells (SSC)

Las SSC son la base celular para la producción continua de espermatozoides a lo largo de la vida del hombre. Suponen el 1% de las células situadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos (Brinster 2002, Oatley and Brinster 2008, de Rooij 2009). Poseen la capacidad de auto-renovación y diferenciación, originando dos poblaciones celulares mediante división asimétrica, una se mantiene indiferenciada, mientras que la otra promueve la diferenciación y espermatogénesis durante toda la (de Rooij 2009).

El nicho testicular está compuesto principalmente por células adyacentes diferenciadas (células de Sertoli), por las propias SSC y por una matriz extracelular que las rodea aportando factores solubles

e interacciones cruciales para su correcto desarrollo. Además, se encuentra asociado al sistema vascular y a las células del intersticio, ya que muchos factores son transportados por la sangre o por las células intersticiales (incluidas las células de Leydig) y posibilitan el mantenimiento y la diferenciación de las SSC (Hofmann 2008)(Figura 8).

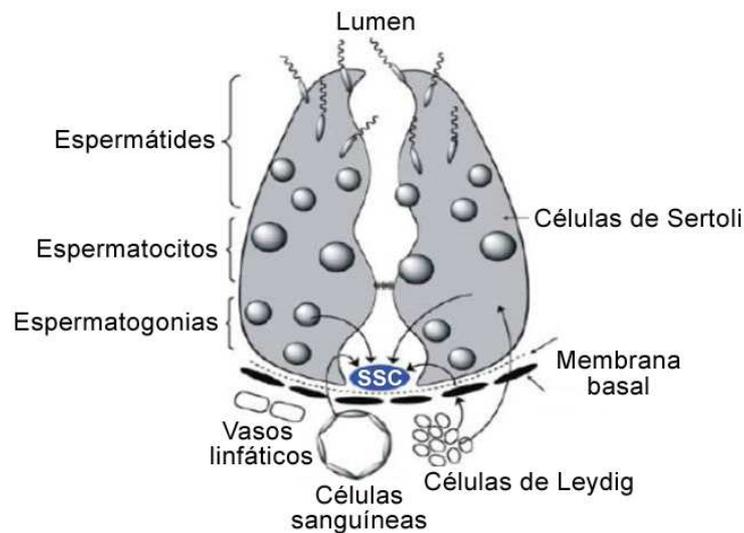


Figura 8. Nicho Testicular (modificada de (Caires, Broady et al. 2010)).

Se ha descrito la existencia de dos patrones de división celular de las SSC, cada uno de ellos da lugar a diferentes destinos (Morrison and Kimble 2006, Stewart, Bendall et al. 2008). El primer tipo da lugar a dos células madre o progenitoras que conservaran su carácter pluripotente (división simétrica), y el segundo da lugar a una célula madre y a una célula susceptible de diferenciación (división

asimétrica) (Stewart, Bendall et al. 2008). El número de células madre presentes en el proceso inicial de diferenciación, puede mantenerse en estado estable cuando la homeostasis de cada célula madre sufre divisiones asimétricas o cuando las divisiones son simétricas dentro de un *pool* celular (Watt and Hogan 2000) (Figura 9).

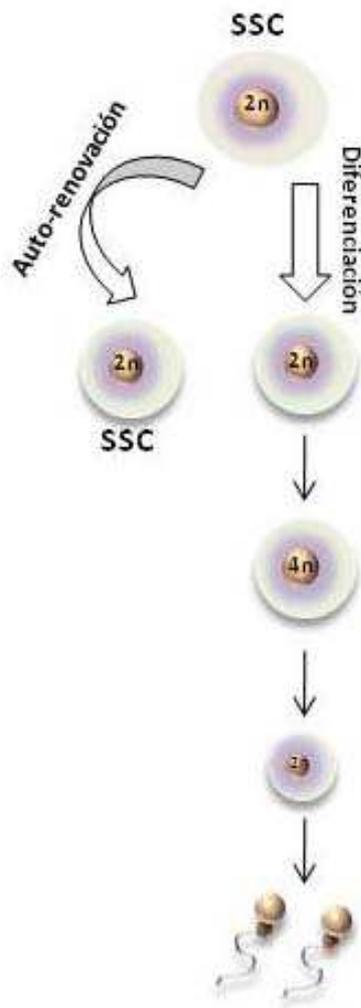


Figura 9. División de las SSC.

La regulación de las SSC, ocurre por señales intrínsecas y extrínsecas, como es la muerte por apoptosis o la actuación de factores sistémicos (Caires, Broady et al. 2010). Gran parte de estos factores son producidos por las células de Sertoli y Leydig siendo secretados en áreas muy particulares del nicho. Uno de los principales reguladores del nicho es el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), secretado por las células de Sertoli. Su actuación es a través de los receptores de la tirosinquinasa Ret y GFR α -1, formando un complejo en la superficie de diferentes tipos de espermatogonias (Meng, Lindahl et al. 2000). Además, GDNF señala y activa diferentes vías en las SSC responsables de la auto-renovación (Braydich-Stolle, Kostereva et al. 2007, Oatley, Avarbock et al. 2007, He, Jiang et al. 2008). Por otro lado, la proliferación de las SSC depende de los niveles de FSH relacionados con la expresión de GDNF en las células de Sertoli (Tadokoro, Yomogida et al. 2002, Simon, Ekman et al. 2007). Otro factor importante en la regulación es el producto de las células peritubulares y de las células de Leydig. La producción del factor estimulador de colonias 1 (CSF1) actúa sobre el mantenimiento de las SSC (Oatley, Oatley et al. 2009). Además, *in vitro*, la producción primaria de GDNF por las células de Sertoli también depende del factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-1 (IL-1) (Simon, Ekman et al. 2007) (**Figura 10**).

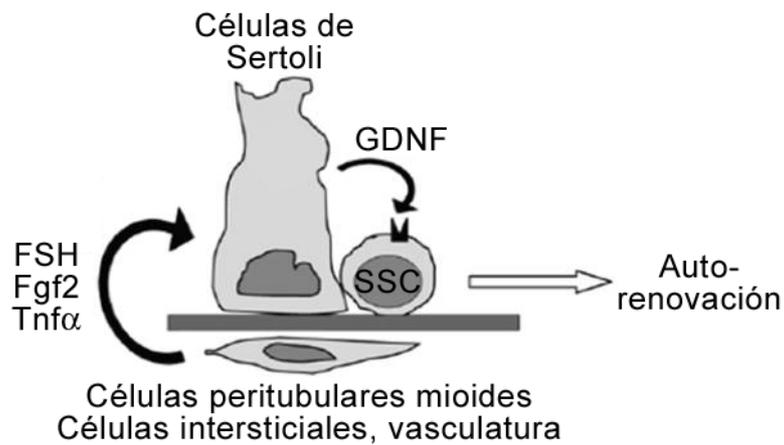


Figura 10. Regulación del nicho testicular (modificada de (Hofmann 2008)).

6.1 Identificación y aislamiento de SSC

Las SSC humanas pueden ser separadas de la población total de células testiculares haciendo uso de la presencia o ausencia de marcadores de superficie específicos. Estas células están localizadas a lo largo de la membrana basal de los túbulos seminíferos, en contacto directo con las matrices extracelulares como el colágeno, la laminina y la fibronectina. En base a esto, los primeros receptores utilizados en su identificación y aislamiento, tanto en ratón como en humano, han sido la $\alpha 6$ -integrina (CD49f o receptor de laminina) y la $\beta 1$ -integrina (receptor de laminina) (Shinohara, Avarbock et al. 1999,

Conrad, Renninger et al. 2008, Maki, Pacchiarotti et al. 2009). En el primer experimento en ratones se realizó una preselección de las espermatogonias mediante adhesión a una matriz extracelular de laminina, fibronectina y colágeno tipo IV, incubando durante 1 hora a 32°C. Las células adheridas a estas matrices eran posteriormente clasificadas respecto a su interacción con anticuerpos frente a β 1-integrina, c-Kit y α 6-integrina y la fracción de células positivas fue trasplantada en los testículos de ratón, previamente tratados con busulfán, de manera que se eliminaba alrededor del 80% de la espermatogénesis testicular. Los resultados de ese primer estudio, demostraron que sólo la población celular positiva para los receptores de laminina y seleccionadas con los marcadores de β 1- y α 6-integrina generaban una actividad espermatogénica significativa tras el trasplante de esta subpoblación celular en testículos previamente tratados con busulfán (Shinohara, Avarbock et al. 1999).

Otros protocolos también han sido empleados en la identificación de marcadores positivos para las SSC como: Thy-1 (CD90), CD9, CD24, Gfr α -1, GPR125 entre otros (**Tabla I**) (Shinohara, Avarbock et al. 1999, Kubota, Avarbock et al. 2003, Buageaw, Sukhwani et al. 2005, Ebata, Zhang et al. 2005, Kanatsu-Shinohara, Miki et al. 2005, Ryu, Kubota et al. 2005, Seandel, James et al. 2007, Conrad, Renninger et al. 2008, Seandel, Falciatori et al. 2008, Dym, Kokkinaki et al. 2009, Kossack, Meneses et al. 2009, Maki, Pacchiarotti et al. 2009, He,

Kokkinaki et al. 2010, Lim, Sung et al. 2010, Izadyar, Wong et al. 2011) Tolkunova et al. 2008).

Tabla I. Marcadores de identificación de las SSCs.

Marcadores de Superficie	Especies	Referencias
CD49f (α 6-integrin)	Mouse	Shinohara et al., 1999
	Human	Conrad et al., 2008
	Primate	Maki et al., 2009
β 1-integrin	Mouse	Shinohara et al., 1999
Thy-1 (CD90)	Mouse	Shinohara et al., 1999
	Rat	Ryu et al., 2005
	Primate	Maki et al., 2009
	Human	Conrad et al., 2008
CD9	Mouse/Rat	Kanatsu-Shinohara et al., 2004
	Human	Lim et al., 2010
CD133	Human	Dym et al., 2009
Ep-CAM	Mouse/Rat	Ryu et al., 2005
E-cadherin	Mouse	Tolkunova et al., 2008
Gfr α 1	Mouse	Buageaw et al. 2005 Ebata et al., 2005
	Human	Kossack et al., 2009
CD24	Mouse	Kubota et al., 2003
GPR125	Mouse	Seandel et al., 2007/2008
	Human	He et al., 2010
SSEA-4	Human	Izadyar et al., 2011

6.2 Protocolos para el Cultivo celular de SSC

Diferentes factores tales como: EGF (factor de crecimiento epidérmico), LIF (factor inhibidor de leucemia), bFGF (factor básico de crecimiento fibroblástico) y SCF (Stem cell factor o factor de células troncales) (Oatley and Brinster 2006) han sido añadidos al medio de cultivo para lograr mantener de forma eficiente el grado de indiferenciación y proliferación.

Los principales protocolos utilizados para el cultivo de SSC y que incluyen la adición de factores son (**Figura 11**):

a) Protocolo CONRAD *et al.*, 2008: Partiendo de testículos completos las células son aisladas y cultivadas 4 días con GDNF, la población obtenida se purifica con el anticuerpo para CD49f y después se mantienen en gelatina con la adición de LIF al medio de cultivo hasta formar colonias celulares con morfología de célula madre embrionaria (ES-like colonies) (**Figura 11a**) (Conrad, Renninger et al. 2008).

b) Protocolo KOSSACK *et al.*, 2009: A partir de una biopsia testicular, las células son aisladas enzimáticamente y mantenidas con bFGF hasta la aparición de colonias y posteriormente mantenidas en

presencia de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) (**Figura 11b**) (Kossack, Meneses et al. 2009).

c) Protocolo GOLESTANEH *et al.*, 2009: A partir de 1g (aprox) de tejido testicular se aíslan las células y siembran sobre MEF con bFGF + TGF- β , hasta la formación de colonias (ES-like colonies) (**Figura 11c**) (Golestaneh, Kokkinaki et al. 2009).

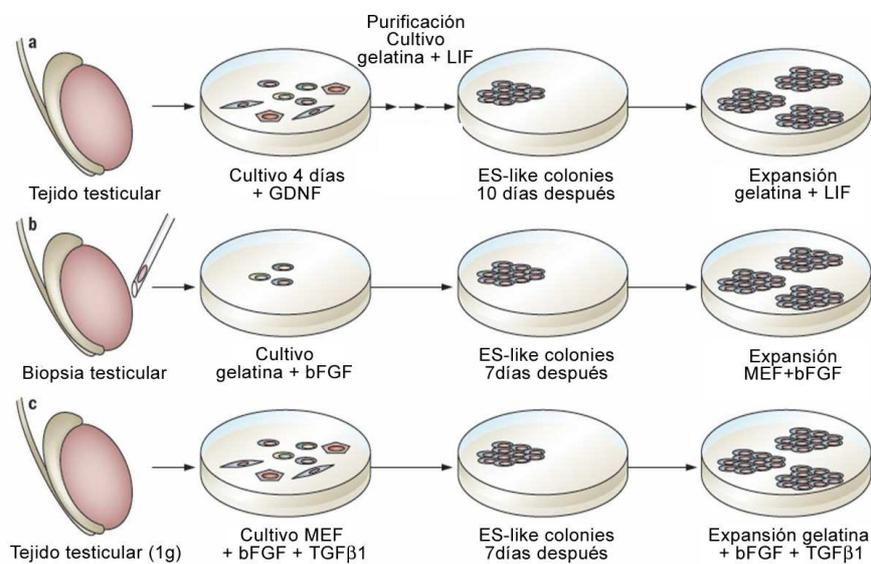


Figura 11. Protocolos de cultivo de SSC humana: a) Protocolo de Conrad; b) Protocolo de Kossack; c) Protocolo de Golestaneh (modificada de (Kee, Pera et al. 2010).

6.3 Trasplante de SSC

En 1994, los investigadores Brinster y Zimmermann publicaron la técnica de trasplante de las SSC en testículos de ratón mutados (Brinster and Zimmermann 1994) (**Figura 12**). La técnica consiste en la inyección de una suspensión de células obtenidas del testículo del donante en los túbulos seminíferos del receptor, el cual carece de células germinales debido a causas endógenas o por tratamiento con quimioterapia (busulfán). Los testículos desprovistos de células germinales y con ausencia de espermatogénesis, después del trasplante de la suspensión celular donde están presentes las SSC, son recolonizados y la espermatogénesis es restablecida (Brinster and Avarbock 1994, Brinster and Zimmermann 1994, Nagano, Avarbock et al. 1999, Oatley and Brinster 2006). En 1999 el grupo de Ogawa estableció el uso de una única dosis de busulfán (40mg/kg) para la inducción de la muerte de las células germinales, obteniendo así ratones infértiles. Esta situación es similar a la que ocurre en pacientes sometidos a quimioterapia, lo que plantea la posibilidad de que éstos pudieran, después de finalizado el tratamiento, ser trasplantados con SSCs autólogas obtenidas de manera previa al tratamiento a través de una biopsia testicular. Estas células podrían recolonizar los testículos, restableciéndose la espermatogénesis. A través de este procedimiento se podría preservar la fertilidad de pacientes con cáncer que deben ser sometidos a tratamiento de quimioterapia (Ogawa, Dobrinski et al. 1999).

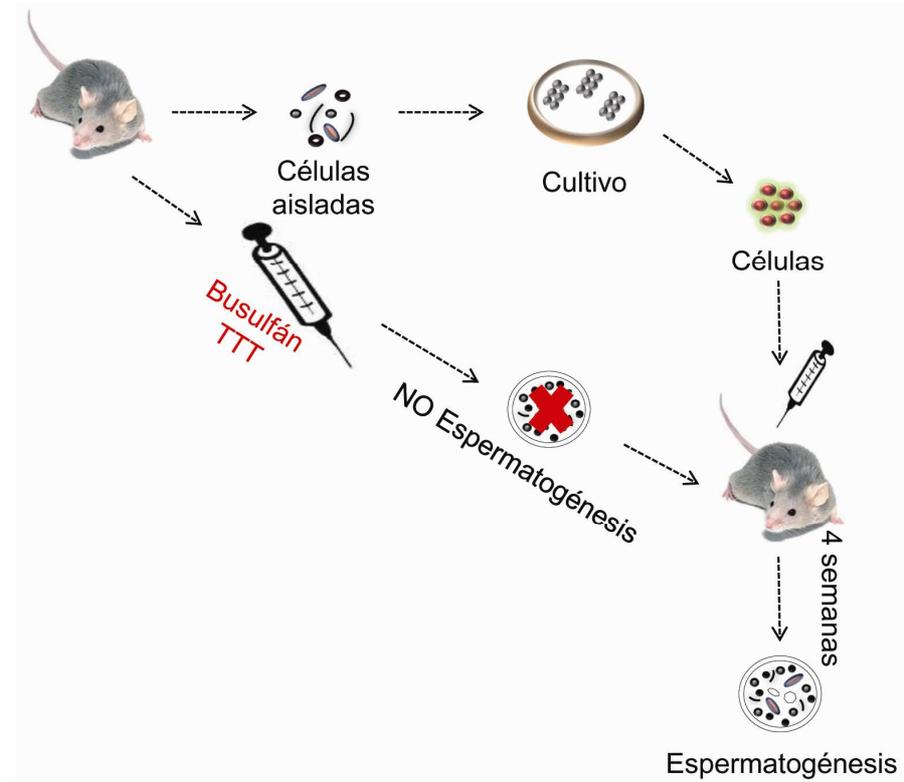


Figura 12: Metodología del trasplante de SSC.

6.4 Espermatogénesis *in vitro*

Los primeros estudios realizados en los años 60 por Steinberger *et al.*,

se refieren al desarrollo de un sistema de intercambio de gases y nutrientes que permite mantener el proceso de espermatogénesis. Utilizando fragmentos completos de túbulos seminíferos, y manteniéndolos en cultivo durante varios días, se obtuvieron gonocitos que alcanzaron el estadio de paquiteno en la meiosis (Steinberger, Steinberger et al. 1964, Steinberger 1975). Con el avance de las investigaciones, los sistemas de cultivo *in vitro* se han ido perfeccionando evaluando la importancia de mantener las interacciones celulares y moleculares presentes en este proceso (Kierszenbaum 1994). Posteriormente, Tesarik *et al.* observaron que en cultivos *in vitro* de células aisladas de tejidos testiculares de pacientes con azoospermia obstructiva, las células redondas aisladas sufrían un alargamiento cuando se adicionaba al cultivo factores como FSH y testosterona, lo que significaba la superación del bloqueo de la espermatogénesis. Cuando estas células alargadas eran inyectadas en oocitos, se producía la fertilización e incluso se obtuvo un embrión que condujo al nacimiento de un niño sano (Tesarik, Guido et al. 1998, Tesarik, Bahceci et al. 1999, Tesarik, Mendoza et al. 2000, Tesarik, Mendoza et al. 2000). Otros estudios han utilizado la técnica del co-cultivo con células de Sertoli, células Vero y la adición de hormonas (FSH, LH, Testosterona) promoviendo la maduración de las células de linaje germinal (Cremades, Bernabeu et al. 1999, Sousa, Cremades et al. 2002). También se han hecho ensayos con el uso de ácido retinoico (AR) que es considerado una hormona esteroidea ya que se une a receptores intracelulares específicos que

posteriormente se unen al DNA y afectan a la síntesis de proteínas implicadas en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular. Se ha descrito, que el AR regula las etapas iniciales de la meiosis en ratones (Koubova, Menke et al. 2006). Por otro lado, se ha publicado, primero en bovinos (toros) y posteriormente en humanos, el cultivo de gonocitos y células de Sertoli, en un modelo tridimensional combinado con el uso de arginina y la adición de suplementos como vitamina C, E, e insulina, que conduce a la obtención de células haploides (espermátidas) (Lee, Kaproth et al. 2001, Lee, Kim et al. 2006). Recientemente, el grupo de Ogawa, demostró que mediante el cultivo *in vitro* de tejido testicular de ratones recién nacidos, conteniendo gonocitos o espermatogonias primitivas, en un medio de cultivo sin suero, se producían espermátidas y espermatozoides (Gohbara, Katagiri et al. 2010, Sato, Katagiri et al. 2011). Sin embargo, hasta el presente, no hay evidencias de que se hayan podido lograr resultados satisfactorios con la completa espermatogénesis *in vitro* en humanos.

HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

Existe una población de SSCs en el testículo que, tras ser aislada, caracterizada y mantenida *in vitro*, podría ser diferenciada mediante los protocolos adecuados hasta dar lugar a espermatozoides. Aplicando los métodos de maduración *in vitro* al entorno clínico, sería posible preservar o restablecer la espermatogénesis en pacientes que así lo requieran.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es el aislamiento, caracterización y diferenciación de la población de SSCs presentes en el testículo humano.

Los objetivos específicos han sido los siguientes:

- Identificar y aislar las SSCs desde biopsias testiculares humanas.
- Mantener *in vitro* la población de SSCs aisladas.
- Caracterizar las células obtenidas mediante el análisis de la expresión de marcadores de pluripotencialidad y de línea germinal.
- Crear un método de diferenciación mediante la utilización de co-cultivo con células de Sertoli para su maduración *in vitro*.
- Verificar mediante inmunohistoquímica y FISH la diferenciación de las SSCs *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) y del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), así como tenido su registro en el Clinical Trials (0902-057-F-CS). Las muestras se obtuvieron previa explicación del proyecto y correspondiente firma del consentimiento informado para cada uno de los pacientes (ANEXO I).

1. Pacientes y Muestras

Los pacientes seleccionados fueron aquellos que, por razones diagnósticas y/o terapéuticas, iban a ser sometidos a biopsia testicular por indicaciones como azoospermia secretora u obstructiva post-vasectomía, para la búsqueda de espermatozoides, con el fin de realizar una inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en el tratamiento de FIV.

Las biopsias fueron tomadas por médicos urólogos (Dr. Manuel Gil-Salom y Dr. José Martínez-Jabaloyas) y recogidas en el laboratorio de Fecundación *In Vitro* (FIV) por técnicos que con la ayuda de un micromanipulador procedían a la búsqueda de los espermatozoides. La muestra restante, formada por tejido y células, fue recolectada para este estudio y procesada mecánica y enzimáticamente para la obtención de la suspensión celular.

2. Disgregación y cultivo celular de las biopsias testiculares

Para evitar cualquier tipo de contaminación por agentes externos, todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

Las muestras fueron recogidas en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI-Valencia) y mantenidas a 4°C durante el traslado hasta los laboratorios del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) para su procesamiento. El procesado de las muestras se llevó a cabo con material adecuadamente esterilizado y en campana de flujo laminar con los pertinentes medios preventivos (uso de guantes, calzas, mascarilla, gorro) y en zonas de cultivo celular asépticas.

Inicialmente, las muestras fueron lavadas tres veces con Dulbecco's PBS (1X) (PAA, Strasse, Austria) y antibióticos penicilina-estreptomicina (100X) (Invitrogen, S.A.) a una concentración de 100U/ml. Tras el lavado se procedió a la disgregación mecánica mediante bisturí, troceando la muestra cuidadosamente hasta obtener fragmentos muy pequeños (1mm²). Tras la disgregación mecánica, se realizaron una serie de lavados con Dulbecco's PBS y penicilina-estreptomicina a 100U/ml. A continuación, se realizó la digestión enzimática mediante el uso de la enzima colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) diluída en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco, Invitrogen S.A.) a concentración 500 mg/ml; esta disgregación se llevó a cabo mediante incubación de 15 minutos a 37°C con agitación (280 rpm). La colagenasa hidroliza el

colágeno en su conformación de triple hélice liberando fragmentos pequeños de tejido y células aisladas. Además se añadió a las muestras el doble del volumen de Tryple™ Select (Invitrogen, S.A.), incubando durante otros 10 minutos a 37°C con agitación (280rpm). El Tryple™ Select (Invitrogen, S.A.) es una enzima recombinante que actúa como la tripsina degradando las proteínas en fragmentos más pequeños. Transcurrido este tiempo y tras verificar visualmente la disgregación de la muestra (no observando grandes fragmentos de tejido) se homogeneizó la suspensión con la ayuda de una pipeta y se filtró a través de un filtro de 50µm de diámetro de poro (Partec, Celltrics) para la obtención de una mezcla de células resuspendidas en medio de cultivo Ko-DMEM (Knockout™ D-MEM) suplementado con 20% de suero bovino fetal (ES cell qualified FBS) (Gibco, Invitrogen S.A.).

Después del aislamiento celular, las células se sembraron en 3 ml de medio en una placa de 10cm² (Falcon, Becton Dickinson, France) y se incubaron 10 minutos a 37°C con 5% CO₂ (Shi *et al.*, 2010). Mediante este protocolo, las células más grandes (células de Sertoli), se adhieren rápidamente a la placa. Por otro lado, las células medianas y pequeñas (las células germinales) que no se han pegado a la placa tras los 10 minutos de incubación, son recolectadas, contadas y sembradas a razón de 1x10⁶ células por placa de 10cm² en medio de cultivo Ko-DMEM (Knockout™ D-MEM) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 20% de suero bovino fetal (ES cell qualified FBS) (Gibco, Invitrogen)) y 4ng/ml de GDNF (Sigma) y se incubó durante 4-

5 días a 32°C con 5%CO₂. Tras este período de tiempo, las células somáticas presentes se adhieren a la placa mientras que las células sanguíneas entran en apoptosis. A esa temperatura (32°C) se pretende simular unas condiciones parecidas a las del propio órgano (Kanatsu-Shinohara, Ogonuki et al. 2003, Kanatsu-Shinohara, Toyokuni et al. 2004, Kanatsu-Shinohara, Miki et al. 2005, de Rooij 2009) (**Figura 13**).

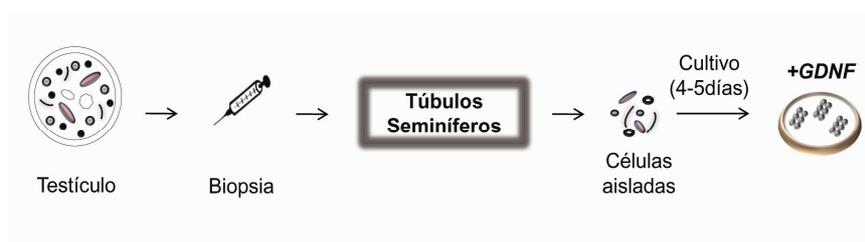


Figura 13. Disgregación de las biopsias testiculares.

3. Cultivo de células de Sertoli

Las células grandes que, tras la disgregación de la biopsia y paso por el filtro, se pegan a la placa en la primera incubación (10 min a 37°C y 5% CO₂), son mantenidas en cultivo y aisladas, con el medio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF) (PAA) a 37°C y 5% de CO₂. Pasados 5 días, las células son tripsinizadas con Tryple™ Select (Invitrogen, S.A.) diluido 1:1 en PBS

(1x) durante 5 minutos a 37°C, contadas y sembradas en nuevos flasks de 25cm² (Falcon). Para la primera expansión, se mantiene el cultivo durante 7 días, con cambios de medio a días alternos (Shi, Zhang et al. 2010).

Para la purificación de las células de Sertoli, nos hemos basado en la identificación de gotas lipídicas depositadas en las células asociado con la fagocitosis de los cuerpos residuales y las células germinales apoptóticas en los túbulos seminíferos (Wang, Wang et al. 2006). Para ello, se ha utilizado la técnica de tinción con rojo nilo (Sigma) y el aislamiento celular por citometría de flujo con capacidad de separación celular de alta velocidad (MoFlo[®] - Modular Flow cytometer Beckman – Coulter, USA). Las células seleccionadas para la separación celular fueron detectadas utilizando un filtro de paso de banda de 570/20nm en amplificación lineal. Las células positivas, eran las células con mayor tinción para el rojo nilo. Éstas fueron separadas y recuperadas en un tubo con medio para posterior cultivo.

El protocolo utilizado para la tinción con rojo nilo consistió en que las células ya purificadas fueron tripsinizadas, contadas y resuspendidas en PBS (1X) a una concentración de 1x10⁶ células/ml e incubadas durante 15 minutos a TA (temperatura ambiente) con 0.5 µg/ml de rojo nilo. Transcurrido este período, las células eran homogeneizadas y filtradas a través de 50µm de poro (Partec, Celltrics). La suspensión celular era llevada al citómetro de flujo con capacidad de separación celular y las células positivas para el marcaje eran separadas (Mather

et al., 1990). Después de la separación, las células positivas para el rojo nilo se sembraron en placas de 6 pocillos con matriz de colágeno (Biocoat Collagen I) (BD - Becton Dickinson, S.A.) (50.000 células por pocillo) y se cultivaron con medio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF) (PAA) a 37°C con 5%CO₂ (Figura 14).

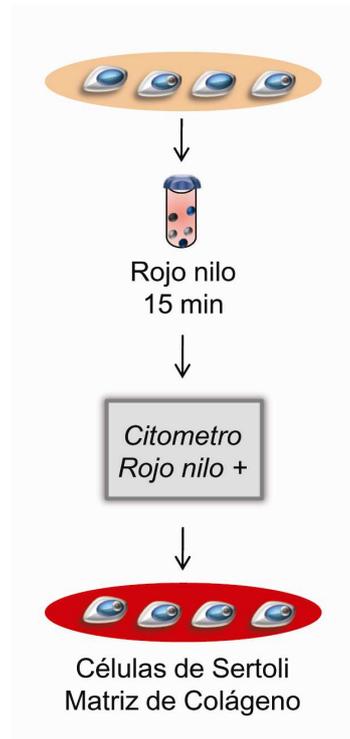


Figura 14. Purificación de las células de Sertoli con rojo nilo.

3.1 Transfección de las células de Sertoli con la proteína roja (RFP - red fluorescent protein)

Tras la purificación con el uso de rojo nilo de las células de Sertoli, las células se mantuvieron en el medio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF) (PAA) durante 7-10 días a 37°C con 5%CO₂ para la futura transfección.

Para ello se usaron células empaquetadoras 293T/17 de ATCC (CRL-11268), el vector lentiviral A179-Helix-UBC-RFP (cedido por Genomics Unit, Spanish National Cancer Centre, CNIO) y los plásmidos GAG POL-BAM HI (virus de supervivencia) y VSVG-ECORT (virus de encapsulación). Las células empaquetadoras fueron descongeladas y sembradas en placa petri de 60mm (Falcon, BD Biosciences Discovery para laboratorio, Bedford, MA) a una concentración de 5×10^5 y fueron mantenidas en cultivo hasta 70% de confluencia antes de iniciar la co-transfección con los plásmidos conteniendo el DNA necesario para la formación de los viriones y la inserción de RFP. Para la co-transfección se mezcló 1 µg de cada plásmido y del lentivirus y se incubó durante 10 minutos. Tras la incubación, se añadió la mezcla de DNA en 100 µl de medio Optimen (Invitrogen) se agitó suavemente con la mano y se mantuvo incubando durante 30 minutos a TA. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio de las células empaquetadoras 293T, luego se añadió la mezcla de DNA con Fugene HD (Roche Diagnostics) a las placas, mezclando lentamente e

incubando durante 48 horas a 37°C con 5%CO₂. Tras 24 horas de incubación, la expresión viral fue observada al microscopio de inmunofluorescencia para la proteína roja fluorescente (RFP). Entonces, se recogió el sobrenadante con los viriones, filtrando con 0.45µm de poro (Partec), se añadió 7.5µg/ml Polybrene (Sigma-Aldrich) y se puso en contacto con las células positivas para rojo nilo, incubando durante 16 horas. Tras la incubación, se procedió al análisis bajo el microscopio de fluorescencia para observar la eficiencia del método (Ruiz-Vela, Aggarwal et al. 2008) (**Figura 15**).

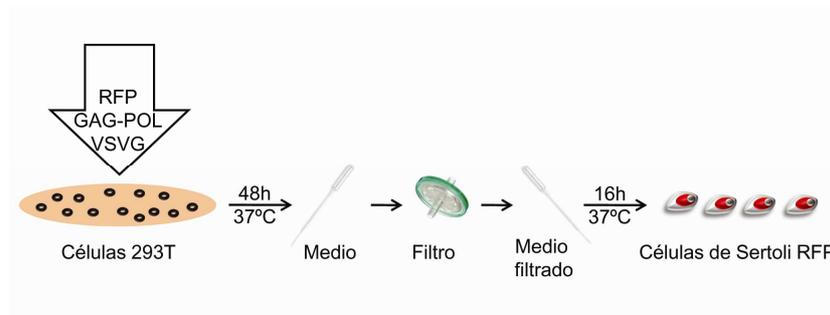


Figura 15. Transfección de las células de Sertoli purificadas.

4. Aislamiento y Cultivo de las Spermatogonial Stem Cell (SSC)

Después de los 4-5 primeros días de cultivo inicial de las células aisladas de la muestra testicular con GDNF, mantenidas a 32°C con 5%CO₂, se procedió a la recogida de las células que no se pegaron a la base de la placa de cultivo. Se recogieron los 3 ml de medio de cultivo

en 1 tubo cónico (Falcon, Beckton Dickinson S.A.) y se realizaron 3 lavados con Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (PAA) conteniendo 100U/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) dejando en la placa la monocapa de células somáticas. Las células recogidas en suspensión se centrifugaron durante 5 minutos a 1.000 rpm y TA, se descartó el sobrenadante y se añadieron 5ml de medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco, Invitrogen) para resuspender las células. Finalmente se filtró con 30µm de diámetro de poro (Partec, Celltrics). En este paso del protocolo, en ocasiones, era posible observar la presencia de demasiados eritrocitos y células muertas. En éstos casos, se procedió a utilizar un buffer de lisis 1:10 (RBC Lysis Buffer (10X)) (Biolegend). Se resuspendieron las células en 5 ml de suero de albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, S.A.) al 5% en PBS y se incubó durante 30 minutos a 4°C (hielo). El BSA está indicado para el bloqueo de las uniones inespecíficas entre antígeno y anticuerpo. Tras el tiempo de incubación, se añadió 5 ml de PBS y se centrifugó 5 minutos a 1.000 rpm y 4°C. Se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de PBS para hacer el recuento celular con la cámara de Neubauer. Del total de células en cada muestra se separaron 10.000 células para hacer de control negativo del anticuerpo. El anticuerpo en uso fue Alexa Fluor® 488 anti-human/mouse CD49f (α6-integrin; Biolegend) a concentración de 10µl por cada 1.10⁶ células en 100µl de medio Ko-DMEM (Knockout™ D-MEM) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 15% de suero bovino fetal (PAA), incubando 45 minutos a 4°C (hielo). Con la fracción de células

destinadas a ser control negativo de la técnica se procedió de la misma manera pero sin añadir anticuerpo. Pasado el tiempo de incubación, se añadió 1 ml de 0,1% de BSA/PBS y se centrifugó durante 5 minutos a 1.000 rpm y TA. Se retiró el sobrenadante y se añadió 500µl medio Ko-DMEM (Knockout™ D-MEM) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 15% de suero bovino fetal (PAA). Se mantuvieron las muestras a 4°C (hielo) hasta el análisis. Posteriormente se añadió Yoduro de Propidio (PI) a concentración 5 µg/ml para excluir las células muertas del análisis (Conrad, Renninger et al. 2008).

Finalmente las células fueron analizadas en el citómetro con capacidad de separación celular (MoFlo® - Modular Flow cytometer Beckman – Coulter, USA). Las células positivas para el Alexa Fluor® 488 anti-human/mouse CD49f se detectaron utilizando un filtro de paso de banda de 525/20nm en amplificación logarítmica. Para excluir las células muertas del análisis y de la separación se utilizó yoduro de propidio (IP), que se detectó con el filtro de paso de banda 613/20nm en amplificación logarítmica. De este modo se seleccionaron las células que excluían IP y eran positivas para CD49f, separándolas en un tubo estéril con 500 µl de medio Ko-DMEM (Knockout™ D-MEM) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 15% de suero bovino fetal (SBF) (PAA) para su posterior cultivo.

Previamente, se hizo la prueba del anticuerpo CD49f para uso en el citómetro con capacidad de separación celular (MoFlo® - Modular Flow cytometer Beckman – Coulter, USA) utilizando muestras de

sangre humana como control positivo ya que este anticuerpo se expresa en células T, monocitos, plaquetas, células epiteliales y endoteliales.

Las células CD49f+ aisladas en el citómetro con separación celular (MoFlo[®] - Modular Flow cytometer Beckman – Coulter, USA) fueron inmediatamente sembradas en 1 pocillo (9,6 cm²) de una placa con matriz extracelular de Colágeno (Biocoat Collagen I)(BD – Becton Dickinson, S.A.) e incubadas durante 4 horas a 37°C, 5%CO₂. Durante este período de incubación las espermatogonias ya diferenciadas y algunas células somáticas se adhieren a la matriz de colágeno. Las células no pegadas a la matriz se recogieron y fueron sembradas en un nuevo pocillo (2 cm²) de una placa (BD – Becton Dickinson, S.A.) con matriz de laminina de placenta humana (Sigma-Aldrich, S.A.) e incubadas durante 1 hora a 37°C, 5%CO₂. Con esta última purificación, las SSC que poseían receptores de laminina se adhirieron a la matriz. El sobrenadante con las células no pegadas se retiró y las células adheridas en los pocillos fueron recogidas con una serie de lavados y suaves pipeteos con Dulbecco's PBS (1x) (PAA). La suspensión de células SSC se centrifugó 3 minutos a 800 rpm y TA para eliminar el sobrenadante y se añadió medio de cultivo fresco y se sembró en un nuevo pocillo recubierto de gelatina para mantener el cultivo celular una vez purificado (Conrad, Renninger et al. 2008) **(Figura 16)**.

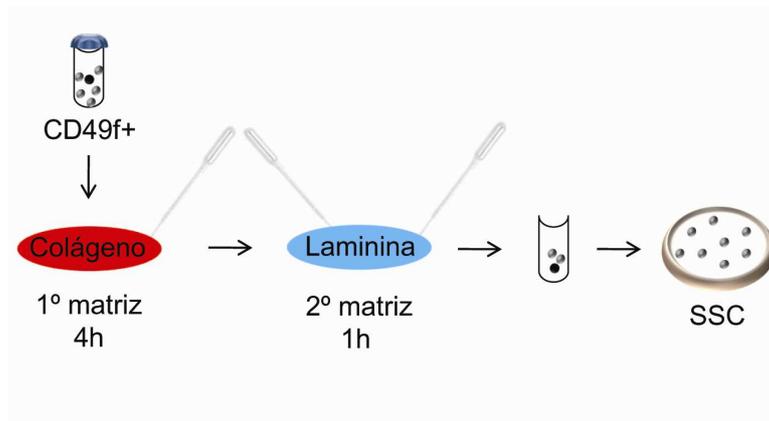


Figura 16. Purificación con las matrices de colágeno y laminina de las células CD49f+ aisladas en el citómetro de flujo.

Tras los distintos pasos de purificación y la obtención de una población casi pura de SSC, se inició el cultivo celular con el medio Ko-DMEM (Knockout™ D-MEM) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 15% de suero bovino fetal (SBF) (PAA) y la adición de factor inhibidor de leucemia (LIF) (Sigma) (medio 1 – M1) a 37°C, 5%CO₂. Éste mismo medio de cultivo fue utilizado para el mantenimiento de los cultivos celulares. El medio se cambió cada 48 horas y se controló el crecimiento celular mediante visualización en el microscopio. Finalmente, las células fueron expandidas cada 5-10 días, utilizando para despegarlas Tryple™ Select (Invitrogen) diluído 1:10 con PBS (1x) durante 5 minutos a 37°C; la reacción se neutralizó con 2 ml de medio, se centrifugó 5 minutos a 1.000 rpm, TA y se realizó el conteo celular con la cámara de Neubauer. Tras cada pase, se hizo una congelación de un mínimo de 100.000 células con 10% de Dimetil

Sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, S.A.), almacenando las células en nitrógeno líquido (NL₂).

4.1 Condiciones de cultivo

Las células fueron mantenidas en incubadores a 37°C con 5%CO₂ y el 95% de humedad. Se utilizaron placas de cultivo BD (Becton Dickinson, S.A.) de distintos tamaños y a diferentes concentraciones celulares: 4 pocillos (1,39 cm² = 5.000cells), 6 pocillos (9,6 cm² = 50.000cells), 12 pocillos (3,8 cm² = 10.000cells) y 48 pocillos (0,75 cm² = 3.000cells).

Los medios de cultivo y los factores utilizados fueron los que se muestran en la **Tabla II**:

Tabla II. Medios de cultivos (Conrad, Renninger et al. 2008, Golestaneh, Kokkinaki et al. 2009, Kossack, Meneses et al. 2009, Sadri-Ardekani, Mizrak et al. 2009, He, Kokkinaki et al. 2010, Mizrak, Chikhovskaya et al. 2010).

Medio ES cell	Medio 1 (M1)	Medio 2 (M2)	Medio 3 (M3)
Ko-DMEM 20% ES cell qualified FBS 1%L-Glutamina 1%Penicilina/Estreptomicina 0.5%Fungizona + 4ng/ml GDNF	Ko-DMEM 15% SBF 1% NEAA 1%L-Glutamina 1%Penicilina/Estreptomicina 0.05mM β-mercaptoetanol + 1.000 U/ml LIF	Ko-DMEM 20% KOS 1% NEAA 1%L-Glutamina 1%Penicilina/Estreptomicina 0.05mM β-mercaptoetanol + 40ng/ml GDNF 10ng/ml b-FGF 1.000 U/ml LIF	Ko-DMEM 20% KOS 1% NEAA 1%L-Glutamina 1%Penicilina/Estreptomicina 0.05mM β-mercaptoetanol + 40ng/ml GDNF 10ng/ml b-FGF 10ng/ml EGF

En primer lugar, se utilizó el medio de cultivo ES cell, específico para el mantenimiento *in vitro* de la pluripotencialidad de las SSC. Tras el aislamiento de las células CD49f+, se añadió el medio M1. Seguidamente se probaron los medios M2 y M3, empleados en el mantenimiento, proliferación y auto-renovación de las SSC.

5. Co-cultivo de células CD49f+ con células de Sertoli para maduración *in vitro*

Para la creación del co-cultivo celular primero sembramos una concentración de 5.000 células de Sertoli RFP en cada pocillo con matriz de colágeno (Biocoat Collagen I)(BD – Becton Dickinson, S.A.) y medio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF) (PAA) durante 24 horas a 37°C con 5%CO₂. Transcurrido el primer día de cultivo, se retiró el medio, se lavó con PBS y luego se añadió el medio de co-cultivo (Ko-DMEM (Knockout™ D-MEM) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 20% KSR (Knockout™ Serum Replacement) (Gibco, Invitrogen)), incubando 2 horas a 37°C con 5%CO₂ (Sato, Katagiri et al. 2011). A continuación, se sembraron las células CD49f+ aisladas en el citómetro con capacidad de separación celular (MoFlo[®] - Modular Flow cytometer Beckman – Coulter, USA) a una densidad de 3.000 células por pocillo, sobre las células de Sertoli RFP y se añadió FSH (1.000 U/ml) (Tesarik, Balaban et al. 1998), Testosterona (1μM) (Tesarik, Guido et al. 1998), GDNF

(40ng/ml) (Spinnler, Kohn et al. 2010) y AR (2 μ M) (Koubova, Menke et al. 2006, Zhou, Li et al. 2008). Se realizaron cambios de medio (dos tercios del volumen) a días alternos. Cada tres días se recogió el medio y se tripsinizaron las células para el análisis por Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Pineau, Dupaix et al. 1999) y la caracterización de la fase de meiosis por inmunofluorescencia **Figura 17).**

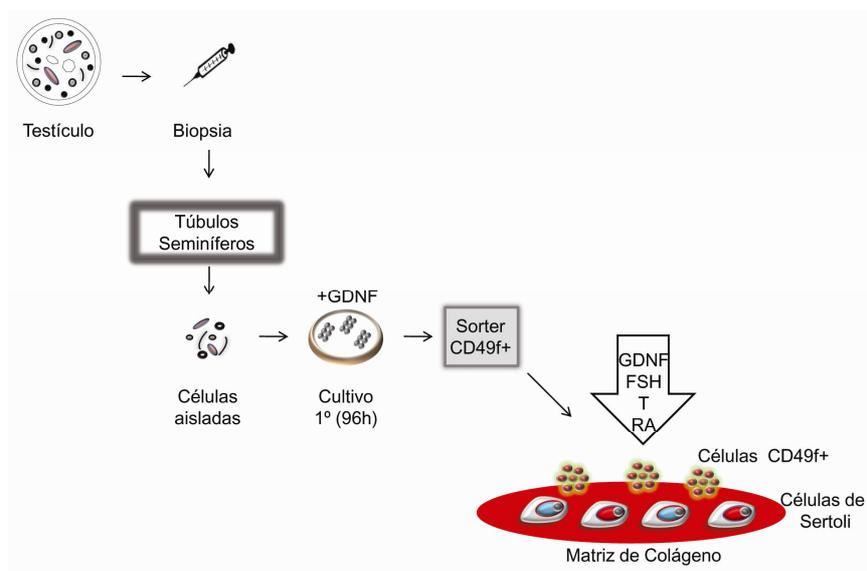


Figura 17. Esquema de la digestión, aislamiento celular y el co-cultivo con las células de Sertoli RFP de las células CD49f+.

6. Caracterización de las células aisladas

6.1 Caracterización molecular

Extracción RNA: La purificación del RNA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del Kit *Quick-RNA™* MicroPrep (Zymo Research). Muestras celulares procedentes de cultivos en adhesión conteniendo entre 1.000 y 100.000 células, fueron tripsinizadas, recogidas y lavadas en 1ml de PBS en un tubo eppendorf libre de RNasas, centrifugando a 800xg durante 5 minutos a TA. El pellet celular se resuspendió en 600µl de ZR RNA Buffer, con la ayuda de un vórtex, y el lisado celular fue transferido a un tubo con columna de purificación del kit (Zymo-Spin™ IC Column Collection Tube). El lisado celular fue centrifugado a 13.400xg durante 1 minuto a TA y el eluido fue descartado. Posteriormente se lavó la columna con 400µl de RNA Pre-Wash Buffer, y dos lavados consecutivos con 700µl y 400µl de RNA Wash Buffer centrifugando después de cada lavado a 13.400xg durante 30 segundos a TA. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se hizo un nuevo lavado con 400µl de RNA Wash Buffer centrifugando a 13.400xg durante 30 segundos a TA. Tras secar la columna con una nueva centrifugación de 13.400xg durante 2 minutos a TA, se eluyó el RNA añadiendo directamente 12µl de agua (DNase/RNase-Free Water) al filtro de la columna en un tubo libre de RNasa nuevo. Tras 5 minutos de incubación a TA, se centrifugó a 13.400xg durante 30 segundos a TA. El RNA extraído se cuantificó con

un NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, DE) determinando el grado de pureza y la concentración de las muestras para futuros análisis.

Retrotranscripción: La síntesis de DNA complementario (cDNA) se llevó a cabo tomando 1µg de RNA, con el uso del Kit de retrotranscripción *Advantage RT-for-PCR Kit* (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU). A cada muestra se le añadió 1µl de oligo-18-dT y agua-DEPC (Dietilpirocarbonato) hasta un volumen final de 12µl y se calentó a 70°C durante 5 minutos para desnaturalizar las cadenas de RNA y evitar la formación de estructuras secundarias de las mismas. Posteriormente, se añadió 8µl a cada tubo de la mezcla de reacción conteniendo: Tampón de reacción 5X: 4µl; dNTP mix (10mM cada uno): 1µl; Inhibidor recombinante de RNAasa: 0,5µl; Transcriptasa reversa MMLV (*Moloney- Murine Leucemia Virus*): 1µl; H₂O DEPC: 1,5µl; Volumen final: 20µl.

*Para un número (n) de reacciones superior a 1 se preparó un mastermix calculando el volumen de cada reactivo para n +1 muestras.

Las muestras se incubaron durante 1 hora a 42°C y 5 minutos a 94°C para detener la reacción y destruir la actividad DNAsa. El producto final fue diluido hasta un volumen total de 100µl con agua-DEPC y cuantificado para determinar pureza y concentración con Nanodrop. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis por PCR.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): La Reacción en Cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA concreto (amplicones), partiendo de un pequeño número de copias.

RT-PCR: Permite la detección cualitativa de amplicones. Para cada reacción de PCR se utilizó ente 300-600ng de cDNA molde en cada reacción de PCR kit (Bioline): 10x NH₄ Reaction Buffer: 5µl; MgCl₂ 50mM: 2µl; dNTPs (10mM): 1µl; Taq polimerasa (5U/ µl): 0,5µl; Primer Forward (Tabla III): 1,5µl; Primer Reverse (Tabla III): 1,5µl.

*Para un número (n) de reacciones superior a 1 se preparó un mastermix calculando el volumen de cada reactivo para n +1.

Se utilizó el siguiente programa: 1 ciclo - Desnaturalización: 94°C - 5 min; 35 ciclos - Amplificación: 94°C - 30 seg/56°C - 30 seg/ 72°C - 1 min; 1 ciclo final - Elongación: 72°C – 10 min.

En la **tabla III** se detallan la lista de genes utilizados en este análisis así como la secuencia de primers empleados para cada uno de ellos:

Tabla III. Primers utilizados para la PCR a tiempo final (RT-PCR).

Gen	Función	Secuencia de primer	p.b.
OCT4	Pluripotencia	<i>AAGAACATGTGTAAGCTGCGGCC GGAAAGGCTTCCCCCTCAGGGAAAGG</i>	455
NANOG	Pluripotencia	<i>GGAAGACAAGGTCCCAGTCA CACCAGGTCTGAGTGTCCA</i>	424
SOX2	Pluripotencia	<i>CCCCGCGGCAATAGCAT TCGGCGCCGGGAGATACAT</i>	448
THY1	Pluripotencia Spermatogonia Stem Cell	<i>TGCCGCCATGAGAATACCA TCAGAGAAGTAGGATCTCTGCA</i>	439
BLIMP1	Primordial Germ Cell	<i>GCCAAGTTCACCCAGTTTGT GATTCGGGTCTCAGATCTTCCA</i>	183
STELLA	Premeiótico	<i>GTTACTGGGCGGAGTTCGTA TGAAGTGGCTTGGTGTCTTG</i>	174
DAZL	Premeiótico	<i>ATGTTAGGATGGATGAAACTGAGATTA CCATGGAAATTTATCTGTGATTCTACT</i>	178
VASA	Premeiótico	<i>AGAAAGTAGTGATACTCAAGGACCAA TGACAGAGATTAGCTTCTCAAAAGT</i>	199

PIWIL2	Premeiótico	<i>TCTATGGGGCCATCAAGAAG CCATCCCGATCACCATTAAC</i>	195
C-KIT	Premeiótico	<i>GCACGGTTGAATGTAAGGCT TCATGGCCGCATCTGACTTA</i>	396
BOULE	Meiótico	<i>ATGTAGCTCCCCTGTGATGG GTGATGGCACTTGGAGCATA</i>	300
DCM1	Meiótico	<i>CTTTCAGGCAGATCCCAAAA CCCAATTCCTCCAGCAGTTA</i>	172
SCP3	Meiótico	<i>GCCGTCTGTGGAAGATCAGT TGGTTAAGCTTCTGCCTTTGA</i>	327
PRM1	Postmeiótico	<i>CACCATGGCCAGGTACAGAT GTCTTCTACATCGCGGTCTG</i>	155
TNP2	Postmeiótico	<i>CACAGGCAAGAAGGAAGAGG AGCCAATGCATTCTTCCAAC</i>	235
GATA4	Células de Sertoli	<i>AGACATCGCACTGACTGAGAAC GACGGTCACTATCTGTGCAAC</i>	475
WT1	Células de Sertoli	<i>TCCTTCATCAAACAGGAGCCGAGC CTGTAGGGCGTCTCAGCAGCAAAG</i>	450

rFSH	Células de Sertoli	<i>CACAGTCCCCAGGTTCCCTTA ATGCTGCTGGCTTTTTCACT</i>	166
GAF	Espermatogénesis	<i>AAGCACAGCTACGGAATGCT ATTGCCAAAGGCTTGAATTG</i>	426
SCF	Células de Sertoli	<i>GCTCCAGAACAGCTAAACGG TCTTTGACGCACTCCACAAG</i>	417
SOX9	Células de Sertoli	<i>GAGGAAGTCGGTGAAGAACG AGACAGCCCCCTATCGACTT</i>	276
GAPDH	Constitutivo. Control interno de expresión.	<i>TGAGCTGAACGGGAAGCTCA GTCTACATGGCAACTGTGAGGA</i>	470

Separación de fragmentos de DNA en gel de agarosa: El producto resultante de la PCR se analizó en gel de agarosa (Pronadisa) (1,5-2%) (Preparado con TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA) (Sigma) y adición de Bromuro de etidio (Sigma) (1:10.000), cargando 15µl de la muestra con 3µl de tampón de carga (BlueJuice Get Loading Buffer (Invitrogen)). En cada lote de muestras se incluyó un marcador de pesos moleculares: 3µl DNA marcador molecular gene ruler 100PB ladder (Fermentas life science, EU), 3 µl colorante (BlueJuice Get

Loading Buffer) (Invitrogen S.A.) y 12 µl de H₂O. Tras 45-60 minutos a 120 voltios, se visualizó el gel en el transiluminador (Biorad).

qPCR: Permite la detección cuantitativa de amplicones. Para cada reacción de PCR cuantitativa se utilizó el Kit Lightcycler® FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green I (Roche), que fueron amplificadas utilizando el Lightcycler 2.0 (Roche). Para cada reacción se utilizó: Master Mix (Previa adición de 14 µl de la enzima): 4µl; Primer Forward (Tabla IV): 1µl; Primer Reverse (Tabla IV): 1µl; cDNA (cada muestra): 500ng; Volumen final: 20µl (completar con H₂O).

*Para un número (n) de reacciones superior a 1 se preparó un mastermix calculando el volumen de cada reactivo para n +1.

Las muestras se amplificaron siguiendo el programa tal como se detalla: 1 ciclo - Desnaturalización: 95°C - 10 min; 40 ciclos - Amplificación-Desnaturalización: 95°C – 10 seg; Annealing: 59°C - 6 seg; Extensión y Lectura: 72°C - 10 seg; 1 ciclo - Curva de Fusión - Desnaturalización: 95°C - 0 seg; Annealing: 65°C - 15 seg; Melting: 95°C - 0 seg (modo continuo); 1 ciclo - Enfriamiento: 40°C - 30 seg.

A continuación se detalla la lista de genes utilizados en este análisis así como la secuencia de primers empleados para cada uno de ellos (Tabla IV):

Tabla IV. Primers utilizados para la PCR a tiempo real (qPCR).

Gene	Característica	Secuencia de primer	p.b.
STELLA	Premeiótico	<i>GTTACTGGGCGGAGTTCGTA TGAAGTGGCTTGGTGTCTTG</i>	174
DAZL	Premeiótico	<i>ATGTTAGGATGGATGAAACTGAGATTA CCATGGAAATTTATCTGTGATTCTACT</i>	178
VASA	Premeiótico	<i>AGAAAGTAGTGATACTCAAGGACCAA TGACAGAGATTAGCTTCTTCAAAAGT</i>	199
FRAGILIS	Primordial Germ Cell	<i>GAGGAACATGAGGTGGCTGT AACCCGTTTTTCTGTATT</i>	374
BOULE	Meiótico	<i>ATGTAGCTCCCCTGTGATGG GTGATGGCACTTGGAGCATA</i>	300
SCP3	Meiótico	<i>GCCGTCTGTGGAAGATCAGT TGGTTAAGCTTCTGCCTTTGA</i>	327
BLIMP1	Primordial Germ Cell	<i>GCCAAGTTCACCCAGTTTGT GATTCGGGTCAGATCTTCCA</i>	183

RPL19	Control interno de expresión.	<i>ACCTGAAGGTGAAGGGGAAT</i> <i>GCGTGCTTCCTGGTCTTAG</i>	140
-------	-------------------------------	---	-----

Controles: Para la realización de las PCR tanto a tiempo final como a tiempo real, se utilizaron numerosos primers con diferentes características y cada uno de ellos tenía su control. A continuación se enumeran los controles utilizados:

- Pluripotencialidad: control positivo = Célula madre embrionaria humana (ESC), control negativo = fibroblasto humano (FSK) y H₂O
- Spermatogonial stem cell (SSC): control positivo = Testículo Humano (Testis), control negativo = H₂O
- Primordial Germ Cell (PGC): control positivo = Testículo Humano, control negativo = H₂O
- Estadío Premeiótico: control positivo = Testículo Humano, control negativo = H₂O
- Estadío Meiótico: control positivo = Testículo Humano, control negativo = H₂O
- Estadío Postmeiótico: control positivo = Testículo Humano, control negativo = H₂O
- Células de Sertoli: control positivo = Testículo Humano, control negativo = H₂O

- Espermatogénesis: control positivo = Testículo Humano, control negativo = H₂O

*ESC (VAL-9) (Banco Nacional de Líneas Celulares – CIPF – Nodo Valencia); Testículo Humano (Human Testis Total RNA) (Nucliber, S.A. Madrid); H₂O Destilada (Gibco; Invitrogen).

Actividad Telomerasa: La Telomerasa es una enzima que está implicada en la síntesis de telómeros y directamente relacionada con el envejecimiento celular. Para su detección cuantitativa, se utilizó el Kit TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit (Chemicon) a partir de 150.000 células tripsinizadas y lavadas con PBS (1x). Para la detección de la actividad Telomerasa, se resuspendió el pellet celular en 200µl de tampón de lisis CHAPS, se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo para su detección.

* Master Mix: 5X TRAPEZE RT Reaction Mix: 4µl; Taq Titanium polymerase (5U/µl) (BD-Clontech): 0,4µl; Agua libre de nucleasas: 13,6µl; Cada muestra 2µl; Volumen final: 20µl.

Programa de PCR a tiempo real en Lightcycler 2.0 (Roche): 1 ciclo - Extensión de la Telomerasa: 30°C - 30 min; 1 ciclo - Desnaturalización: 95°C - 2 min; 45 ciclos: 94°C - 15 seg/59°C - 60 seg/45°C - 10 seg.

Los datos obtenidos se utilizaron para calcular de forma cuantitativa la cantidad de enzima Telomerasa al comparar con la curva estándar realizada con el molde TSR8 (control positivo interno de cuantificación) y los controles recomendados en el Kit.

El control positivo fue una muestra de ESC (VAL-9), tratada de la misma forma que la muestra analizada. Como control negativo, se trató con calor una alícuota de cada muestra analizada incubando a 85°C durante 10 min antes de realizar el ensayo de TRAP para inactivar la Telomerasa ya que es una enzima sensible al calor.

6.2 Análisis cromosómico

Cariotipo: Previo al análisis se preparó 4ml de fijador Carnoy (3 partes de metanol (Panreac) y 1 parte de ácido acético (JT Baker)) y se almacenó a -20°C; por otro lado, se atemperaron a 37°C (Gibco) 750µl de KCl 0,075M, por cada muestra a procesar. A partir de 150.000 células tripsinizadas, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a TA, se eliminó el sobrenadante y se añadió al pellet 0,4µg/ml de KaryoMAX Colcemid (Gibco) incubando durante 45 minutos en baño a 37°C. Tras la incubación, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a TA, se retiró el sobrenadante, se resuspendieron las células en KCl 0,075M y se incubaron 15 min a 37°C. Concluida la

incubación, se fijaron las células con Carnoy (haciendo 4 lavados). Una vez terminados los lavados, se mantuvieron las muestras en Carnoy almacenadas a -20°C hasta enviar al laboratorio externo de análisis citogenético del IVI – Murcia a espera de resultados.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH): Los análisis del FISH se llevaron a cabo sobre dos tipos celulares diferentes para cada una de las muestras recogidas: células CD49f+ y células de Sertoli RFP. Primero se realizó sobre 1.000-3.000 células CD49f+ aisladas con el citómetro de flujo con capacidad de separación celular. En segundo lugar se realizó el FISH sobre las células de Sertoli RFP. Por último, transcurrido el tiempo de co-cultivo entre las células CD49f+ y las células de Sertoli RFP, se recogieron todas para el análisis. Se conservaron las células con su medio de cultivo a TA hasta empezar el protocolo de fijación.

Para la fijación, se incubaron 15 minutos con KCl 0,075M (Gibco) a 37°C en estufa. Después del tiempo de incubación, se centrifugó durante 10 minutos a 600xg a TA y se descartó el sobrenadante. A continuación se resuspendieron los pellets (sedimento) en 500µl de fijador Carnoy (3metanol:1ácido acético) (Merck) gota a gota y con agitación en el vórtex para evitar posibles aglutinaciones o grumos que pudieran impedir posteriormente realizar correctamente el recuento. Se centrifugó 5 minutos a 600xg a TA, se descartó de nuevo el sobrenadante y se añadieron otros 500µl de fijador Carnoy (gota a

gota). Finalmente, se centrifugó otros 5 minutos a 600xg a TA y se añadió gota a gota el fijador hasta conseguir unas soluciones semitransparentes. Se extendieron las muestras en portaobjetos (Superfrost ultra plus, VWR International Eurolab, S.A.) dejando caer una gota de la dilución en el centro del portaobjetos desde una altura de 20-25 cm y finalmente se almacenaron los portaobjetos a -20°C hasta el día de la hibridación.

Para la hibridación, primero se retiraron las muestras del congelador (-20°C) y se dejaron 5 minutos a TA. Se marcó con un lapiz de diamante el área que recogía el centro de la gota donde se tenía extendida la muestra en el portaobjetos.

Se realizó un lavado de 2 minutos en 2X SSC (Citrato Sódico Salino) (Vysis Inc.) a TA y se deshidrataron las muestras en una serie de alcoholes a concentración creciente (EtOH al 70, 85 y 100%) (Merck) durante 2 minutos en cada alcohol y se dejó secar. Se aplicaron, en cubreobjetos de 15mm, 5µl del mix de la sondas para los cromosomas 18, X e Y (ADN Poseidon, Kreatech diagnostics) o 13, 21 (Vysis Inc.) y otros 5µl del Buffer Vysis (Vysis Inc.) para cada muestra. Se depositaron los cubreobjetos sobre el área de cada muestra marcada al inicio en el portaobjetos y se sellaron con cola.

Las muestras fueron incubadas en una plataforma calentadora (Hybrite Vysis) (Vysis Inc.) donde se procedió a una co-desnaturalización con una rampa de 5 minutos a 73°C y una posterior incubación durante toda la noche a 37°C.

Para la detección, se eliminó la cola y se retiraron los cubreobjetos deslizando suavemente. Se lavaron las muestras 30 segundos en 0.4X SSC (Vysis Inc.) (atemperado en un baño térmico a $73^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y posteriormente 10 segundos con 2X SSC – NP40 (Vysis Inc.) a TA. Se dejaron secar y se aplicaron 10 μl de una contratinción de DAPI II (Vysis Inc.). Se colocaron cubreobjetos, se sellaron y se miraron al microscopio de fluorescencia.

6.3 Inmunocitoquímica

Tras la expansión y cultivo celular, los pocillos con las muestras celulares en confluencia se fijaron con Paraformaldehído (PFA) al 4% (Electron Microscopy Sciences) durante 20 minutos a TA, lavando 2 veces con PBS (1X).

Detección de antígenos de superficie: Se retiró el PBS y se lavaron las células 3 veces con Rinse Buffer 1X (20 mM Tris (Fluka) - HCl (J.T. Baker) + 0,15M NaCl (Sigma-Aldrich) + 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich) + PBS (PAA)), se permeabilizó durante 10 minutos con 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) y se bloqueó con suero normal de cabra (NGS) (normal goat serum) al 4% (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. Tras permeabilización y bloqueo, las células fueron

incubadas 1 hora a TA con los anticuerpos primarios, en la dilución correspondiente tal y como se detalla en la tabla V. Tras 3 lavados con Rinse Buffer 1X, se incubaron las células 1 hora en oscuridad, con los anticuerpos secundarios adecuados. Finalmente se hicieron otros 3 lavados con Rinse Buffer 1X y se montó con medio de montaje con DAPI como contratinción (Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI) (Molecular Probes) y se observaron en el microscopio de fluorescencia.

Tabla V. Anticuerpos y diluciones empleados en los ensayos de inmunocitoquímica para la detección de antígenos de superficie.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
Alexa Fluor 488 anti-human/mouse CD49f (Biolegend)	1:100	-	-
Rabbit polyclonal GPR125 (Abcam)	1:200	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes)	1:500
CD133-allophycocyanin (APC) antibody (MACS)	1:100	-	-
Mouse anti-human THY-1 monoclonal antibody - Phycoerithrin conjugated (Chemicon)	1:100	-	-

Mouse anti-human SSEA-4 antibody (Chemicon)	1:50	Goat anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)	1:500
VASA (DDX4 / MVH) antibody - Primordial Germ Cell Marker (Abcam)	1:100	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes)	1:500
Mouse monoclonal Vimentin antibody (Abcam)	1:200	Goat anti-mouse IgG1-Alexa Fluor 568 (Molecular Probes)	1:500
Monoclonal mouse anti-Human Muscle Actin antibody (DakoCytomation)	1:50	Alexa Fluor 568 Goat anti-mouse IgG (Molecular Probes)	1:100
Mouse anti tubulin β -III antibody (Chemicon)	1:100	Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (Molecular Probes)	1:500
Monoclonal anti α -fetoprotein antibody (Sigma)	1:100	Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (Molecular Probes)	1:500

Detección de antígenos nucleares: Se retiró el PBS y se lavaron las células 3 veces con BSA 0,1% (Sigma-Aldrich). Para permeabilizar y bloquear se incubaron durante 45 minutos a TA con 0,1% Triton (Sigma-Aldrich), 10% suero normal de cabra (NGS) (normal goat serum) (Sigma-Aldrich) y 1% BSA (Sigma-Aldrich). Transcurrido ese tiempo, se lavaron 3 veces con BSA 0,1% y se dejaron incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario Rabbit polyclonal Gata-4 antibody (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Al día siguiente, se lavaron 3 veces con BSA 0,1% y se incubaron durante 1 hora a TA y

oscuridad con el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 488 (1:500) (Molecular Probes). Finalmente, se lavaron 3 veces con BSA 0,1% y se montaron con medio de montaje con DAPI como contratinción (Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI) (Molecular Probes) y se observaron en el microscopio de fluorescencia.

Análisis de la Meiosis: Para el análisis de las diferentes fases en las que las células se encuentran según la etapa de la meiosis, se utilizaron los anticuerpos SCP-3 Purified rabbit anti sera (Novus Biologicals) (SCP3), Mouse Anti-MLH1 Monoclonal Antibody (Becton Dickinson) (MLH1) y Human anticentromere protein CREST (Fisher Scientific) (CREST) con sus respectivos secundarios.

Después de recoger las células, pasados los tiempos de co-cultivo y tras lavarlas con PBS 1x (PAA), se incubaron con 0,075M KCl (Gibco) durante 15 min a 37°C (baño) y directamente se fijaron con PFA 1% (Electron Microscopy Sciences), haciendo una gota en el centro de los portas manteniendo toda la noche a 37°C en cámara húmeda. Transcurrida la fijación, al día siguiente, se hizo un lavado de 2 min de incubación en Photoflo (Kodak) (200µl de Photoflo + 50ml de H₂O) y se dejaron los portas secar durante 1h a TA para empezar con la inmunocitoquímica.

Primero se preparó una solución stock ADB 10x (ADB, del inglés antibody dilution buffer): 2,5ml suero normal de burro (NDS) (Sigma-aldrich); 12.5µl Triton X-100 (Sigma); 0,75g BSA (Sigma-aldrich) y 22,5ml de PBS (PAA). Se filtró a 0,45µm de tamaño de poro y se añadió 250µl de azida sódica (Sigma-aldrich).

Para la solución de uso, se diluye el ADB al 1x con PBS (PAA).

Tras secarse los portaobjetos, en día 1 se incubaron 45 min a TA con ADB 1x. Una vez transcurrida la incubación, se añadieron los anticuerpos primarios CREST (1:100) y MLH1 (1:65) diluidos en ADB 1x y se incubaron toda la noche en cámara húmeda a 37°C. El día 2 se lavaron los portas con ADB 1x y se añadió el tercer anticuerpo primario SCP3 (1:75) incubando durante 2h y 30 min en cámara húmeda a 37°C. Se lavaron 2 veces de 20 min a TA con ADB 1x y se añadieron los anticuerpos secundarios FDAM (1:65) (FDAM anti-mouse, Jackson labs) y ADAH (1:100) (ADAH anti-human, Jackson labs), correspondientes a los primeros anticuerpos primarios, incubando toda la noche en cámara húmeda a 37°C y protegido de la luz. A partir de éste momento, todo el proceso se llevó a cabo en oscuridad. En el día 3, se lavaron los portas durante 30 min con ADB 1x y se añadió el tercer anticuerpo secundario Rhodamine Donkey AntiRabbit (RDAR) (1:100) (Jackson labs) incubando 1h en cámara húmeda a 37°C. Para finalizar, se lavaron 2 veces de 10 min con PBS 1x y se montaron con 2 gotas de Antifade (Mounting Medium, INOVA

Diagnostics) y el cobre, y se observaron al microscopio de fluorescencia.

Los controles positivos y negativos para todos los anticuerpos son:

- CD49f:
 - control positivo: linfocitos humanos
 - control negativo: células mesenquimales humanas
- THY-1:
 - control positivo: células mesenquimales humanas
 - control negativo: fibroblastos humanos (FSK)
- GPR125:
 - control positivo: testículo humano
 - control negativo: células mesenquimales humanas
- CD133:
 - control positivo: células HUH-7
 - control negativo: células mesenquimales humanas
- SSEA-4:
 - control positivo: ESC
 - control negativo: fibroblastos humanos (FSK)
- Vimentina:
 - control positivo: células mesenquimales humanas
 - control negativo: células MCF-7
- Gata-4:
 - control positivo: cardiomiocitos de ratón

- control negativo: fibroblastos humanos (FSK)

6.4 Tinción de lípidos (Oil Red)

Con objeto de verificar que las células que fueron aisladas por tinción con rojo nilo y separadas con el citómetro de flujo eran células de Sertoli, se realizó una tinción con Oil Red para observar la presencia de gotas lipídicas. Para eso, se preparó una solución al 0,5% de Oil Red (Sigma) en isopropanol al 100% (J.T.Baker), se filtró 2 veces a través de un poro de 0,45 μ m (Partec) y se diluyó la solución stock (3:2) para el uso, filtrándose nuevamente 2 veces. Para la tinción, se fijaron las células con PFA 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS a 4°C, se incubaron durante 5 minutos a 150 rpm, se lavaron 3 veces con PBS a 4°C, se hizo contratinción de las muestras con hematoxilina filtrada durante 3 minutos, se lavó con H₂O y las muestras teñidas se observaron al microscopio.

6.5 Diferenciación *in vitro*

Para la diferenciación *in vitro* se partió de un mínimo de 500.000 células tripsinizadas y se utilizó el medio de Diferenciación (Ko-DMEM (Knockout™ D-MEM) (Gibco, Invitrogen) + 20%SBF (PAA)) para realizar los 2 métodos detallados a continuación:

Diferenciación espontánea: Primero se lavaron las células con 1ml de PBS y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos a TA, se resuspendieron las células en 4ml de medio de Diferenciación y se colocaron en 1 pocillo de una placa no adherente (Costar ultralow attachment; Corning Incorporated). Tras 5-7 días de cultivo en suspensión a 37°C y 5%CO₂, las células formaron cuerpos embrioides (EBs), que fueron transferidos a placas con 0.1% de gelatina (Sigma-Aldrich) y transcurridos 10-15 días en cultivo se fijaron con PFA al 4% (Electron Microscopy Sciences) durante 20 minutos a TA, lavando 2 veces con PBS (1X), para la realización de la inmunocitoquímica.

Diferenciación dirigida: Primero se lavaron las células con 1ml de PBS y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos a TA, se resuspendieron las células en 4 ml de medio de Diferenciación y se colocaron en 1 pocillo de una placa no adherente (Costar ultralow attachment; Corning Incorporated). Tras 5-7 días de cultivo en suspensión a 37°C y 5%CO₂, se transfirieron los EBs formados a

placas gelatinizadas y se añadieron los factores para dirigir la diferenciación a cada una de las 3 capas germinales (Tabla VI). Se cultivaron durante 15-20 días y se fijaron con PFA al 4% (Electron Microscopy Sciences) durante 20 minutos a TA, lavando 2 veces con PBS (1X), para la realización de la inmunocitoquímica.

Tabla VI. Medios de cultivo para la diferenciación a las 3 capas germinales.

Ectodermo	Medio de Diferenciación + Medio Neural (Invitrogen, S.A.) + 0.5% N2 (Invitrogen, S.A.) 1% B27 (Stem Cell Technologies European)
Endodermo	Medio de Diferenciación + 100ng/mL Activin A humana (Vitro S.A.)
Mesodermo	Medio de Diferenciación + 0.5mM Acido ascórbico (Sigma-Aldrich)

* Como control de la técnica y de la eficiencia de los protocolos, se utilizó una línea de ESC (VAL-9).

6.6 Diferenciación *in vivo*

Para la inyección celular, un mínimo de 500.000 células fueron tripsinizadas, lavadas con PBS y resuspendidas en 30µl de PBS. En una placa de Petri se hicieron gotas con 30µl de PBS que contenían las células y con una jeringa de 1ml (U-100 insulina) (BD Plastipack) y agujas de 0,3 X 13mm (BD Plastipack) se cargaron las células. El ensayo se llevó a cabo con ratones macho inmunodeprimidos (SCID). Las jeringas cargadas con las células fueron trasladadas en frío hasta la zona SPF del animalario del CIPF momentos antes de empezar el procedimiento. Antes de la inyección testicular, los ratones fueron anestesiados por inhalación con isoflurano (5%) y tratados con analgésico intraperitoneal (dosis 0,1 mg/Kg) (100µl buprenorfina + 900µl suero). Con el animal dormido, las células fueron inyectadas en el lumen testicular. La reanimación de los ratones se llevó a cabo de forma espontánea. Tras 8 semanas se sacrificaron los animales con CO₂ y se extrajeron los testículos, que tras ser fijados en PFA 4%, fueron enviadas para inclusión en parafina y análisis morfológico en un laboratorio de anatomía patológica externo.

* Como control de la técnica y de la eficiencia de los protocolos, se utilizó una línea de ESC (VAL-9).

6.7 Microscopía Electrónica de Transmisión (ME)

Para el análisis de las muestras, se sembraron cerca de 5.000 células por pocillo (Chamber slide system) (Nalge Nunc International) con el medio correspondiente y se cultivaron durante 5 días a 37°C y 5%CO₂. Tras el tiempo de cultivo, se retiró el medio y se hicieron 3 lavados de 2 minutos cada uno con PB 0.1% (Electron Microscopy Sciences) a TA, se añadió Glutaraldehído 3,5% (Electron Microscopy Sciences) diluido en PB 0.1% y se incubó durante 1 hora a 37°C para la fijación. Finalmente se quitó el Glutaraldehído y se hicieron 5 lavados de 2 minutos cada uno con PB 0.1% a TA y finalmente se enviaron las muestras en PB 0.1% a 4°C para la preparación y análisis en el Laboratorio de Morfología Celular del CIPF (Dr. García-Verdugo). Las células fueron posteriormente fijadas en 2% OsO₄ durante 1 hora a TA y se tiñeron en acetato de uranilo al 2% en la oscuridad durante 2 horas a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas en tampón fosfato de sodio (0,1 M; pH 7,2), se deshidrataron en etanol, y se infiltró durante la noche en Araldita (Durcupan, Fluka, Buchs SG, Suiza). Después de la polimerización, las células se encontraban en bloques de Araldite. Se realizaron cortes semifinos (1,5 mm) seriados. Las secciones fueron cortadas con un Ultracut UC-6 (Leica), montadas en portas y teñidas con azul de toluidina al 1%. Los cortes semifinos seleccionados que estaban pegados (Super Glue, Loctite) en los bloques de Araldita, fueron separados con la ayuda de una lámina de

vidrio por congelación (en nitrógeno líquido) y descongelación. Los cortes ultrafinos (0,06-0,09 mm) fueron tenidos con citrato de plomo. Por último, las fotomicrografías se obtuvieron bajo el microscopio de transmisión electrónico (FEI Tecnai G2 Espiritu Biotwin) utilizando una cámara digital (Morada, Soft Imaging System de Olympus).

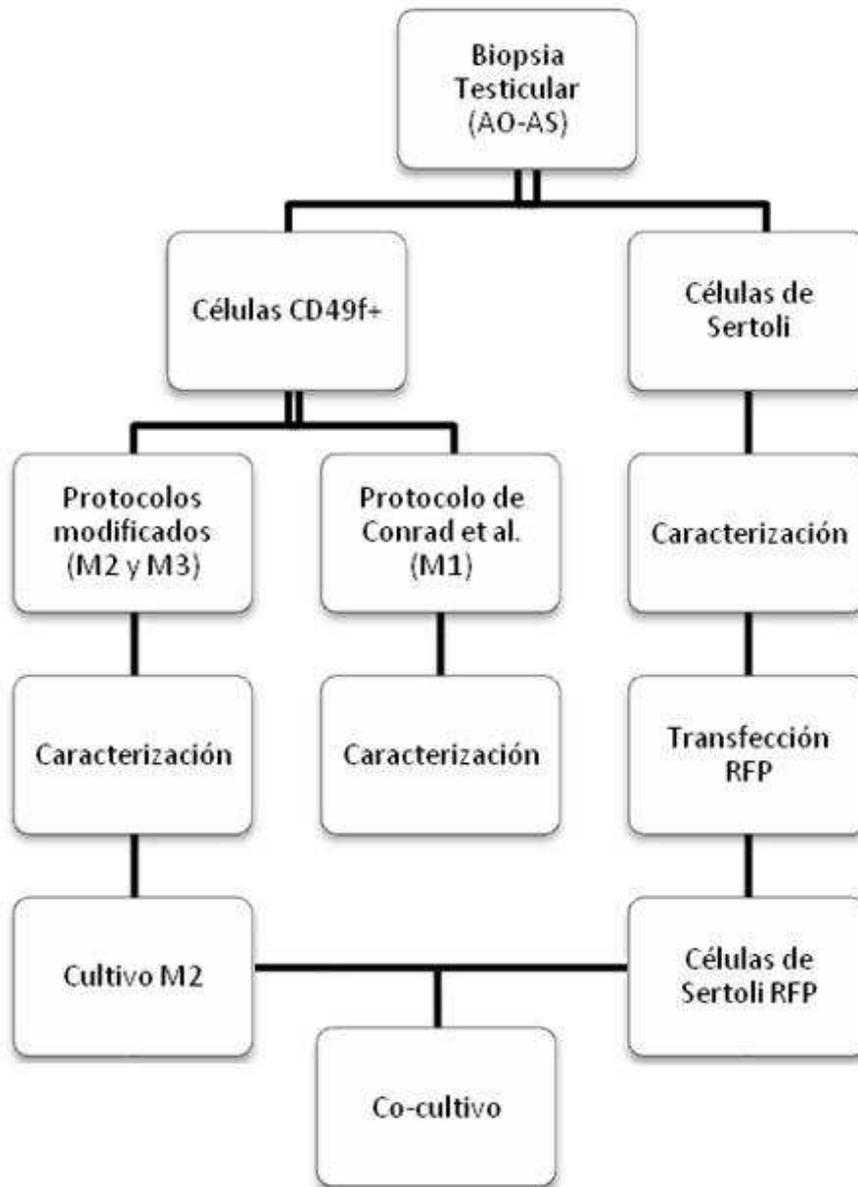
7. Análisis estadístico de los datos obtenidos

Las estadísticas descriptivas se obtuvieron a partir del análisis de los datos de las muestras testiculares obtenidas. Se calcularon, entre ellos la media y la desviación típica de las biopsias de pacientes con azoospermias obstructivas y secretoras.

Por otro lado, se calculó el porcentaje de células CD49f+ recuperadas en las muestras testiculares tras la disgregación.

Todos estos análisis fueron llevados a cabo mediante el uso del programa informático *Statistical Package for the Social Sciences for Windows, version 12.0* (SPSS, Chicago, EEUU). El nivel de significancia elegido *a priori* fue el de p-valor < 0,05.

8. Esquemática de los Materiales y Métodos



RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Disgregación celular de las biopsias testiculares.

Un total de 65 biopsias testiculares (BT) procedentes de pacientes con azoospermia obstructiva (AO)(n=34) o secretora (AS)(n=31) con cariotipo normal (46, XY) fueron estudiadas. Las muestras obtenidas fueron utilizadas en el laboratorio de FIV para buscar espermatozoides, una parte se destinó al estudio de anatomía patológica y la parte restante, no utilizada, fue donada para este proyecto después de que el paciente firmara el correspondiente consentimiento informado.

La media de células obtenidas tras la disgregación y digestión enzimática fue de 1.754.230 células por biopsia. Este número fue similar en todos los pacientes independientemente de la etiología de la enfermedad (AO o AS) (Tabla VII).

Tabla VII. Número de células obtenidas tras disgregación de la BT.

Células obtenidas tras disgregación							
Muestras	N	Media	Límite inferior (IC 95%)	Límite superior (IC 95%)	Mínimo	Máximo	Significancia $p < 0,05$
AO	34	1.810.294,12	1.217.328,30	2.403.259,93	125.000	7.200.000	0,788
AS	31	1.692.741,94	1.027.878,33	2.357.605,54	45.000	9.000.000	
Total	65	1.754.230,77					

2. Aislamiento de las células CD49f+

Tras la digestión enzimática de las biopsias, las células fueron mantenidas en cultivo entre 4 y 5 días con medio Ko-DMEM suplementado con 20% SBF (ES cell qualified) y con la adición de GDNF (4ng/ml) (**Figura 18**).

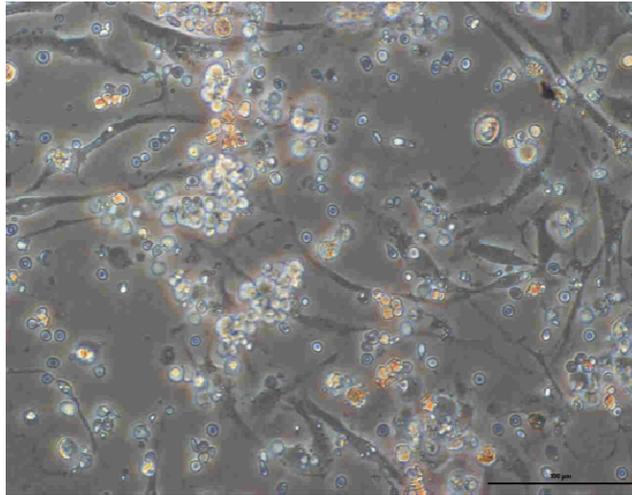


Figura 18. Morfología celular del cultivo tras la disgregación de la BT.

Del total de muestras estudiadas, 5 tuvieron que descartarse por problemas de contaminación por hongos ó bacterias. Después de esta primera etapa de cultivo, las células o agregados celulares no adheridos o levemente adheridos a la monocapa celular estromal, fueron suavemente pipeteados y recogidos para el aislamiento de las células CD49f+ en el citómetro de flujo (**Figura 19**). En este paso, 7 muestras fueron descartadas por presentar necrosis celular.

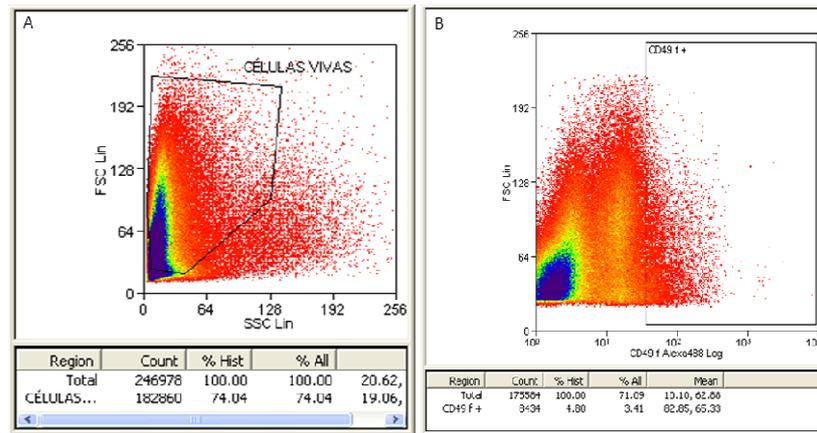


Figura 19. Aislamiento celular de las CD49f+ en el citometro de flujo (A: células vivas; B: células positivas para el anticuerpo CD49f).

Independientemente de la patología diagnosticada, se pudieron aislar células CD49f+ de todas las biopsias finalmente procesadas. Se obtuvo un 75% de viabilidad celular tras el protocolo de disgregación y cultivo. En las muestras donde la espermatogénesis se encuentra conservada (AO) se pudo aislar el doble de células CD49f+ que en las muestras con alguna patología asociada al bloqueo o disfunción en la formación de los espermatozoides (AS) (**Tabla VIII**).

Tabla VIII. Número de células CD49f+ obtenidas tras la disgregación.

	Muestras	N	Media	Límite inferior (IC 95%)	Límite superior (IC 95%)	Rango	Significancia p (ANOVA)
Células CD49f+	AO	34	39.057,44	5.276,02	72.838,87	0 - 500.000	0,073
	AS	31	6.643,47	3.345,28	9.941,66	0 - 33.000	
% células CD49f+ recuperada	AO	34	1,3156	0,6983	1,9329	0 - 7,2	0,045
	AS	31	0,5915	0,2737	0,9093	0 - 3,06	

3. Protocolos de cultivo y caracterización de células CD49f+

3.1 Protocolo de Conrad *et al* (M1)

En las 35 primeras muestras, se siguió el protocolo descrito en la publicación de Conrad *et al.*, (2008), según la cual las células CD49f+ aisladas eran incubadas secuencialmente en 2 tipos de matrices: colágeno, laminina y a continuación mantenidas en gelatina con medio M1 (Conrad, Renninger *et al.* 2008). Como resultado se obtuvieron 10 líneas celulares denominadas Testicular Biopsy Lines (TBLs).

La expansión de las células se realizó cada 5-7 días, de acuerdo a la velocidad de proliferación celular. Todas las TBLs presentaban una morfología celular mesenquimal típica. Estas TBLs fueron caracterizadas en cada pase y criopreservadas. El análisis mediante ME confirmó la morfología celular fibroblástica al cultivar las células con medio M1, mostrando retículo endoplasmático rugoso con cisternas dilatadas, autofagosomas, núcleo con abundantes invaginaciones, cerca de 2 nucléolos por célula y mitocondrias no muy electrodensas (**Figura 20**).

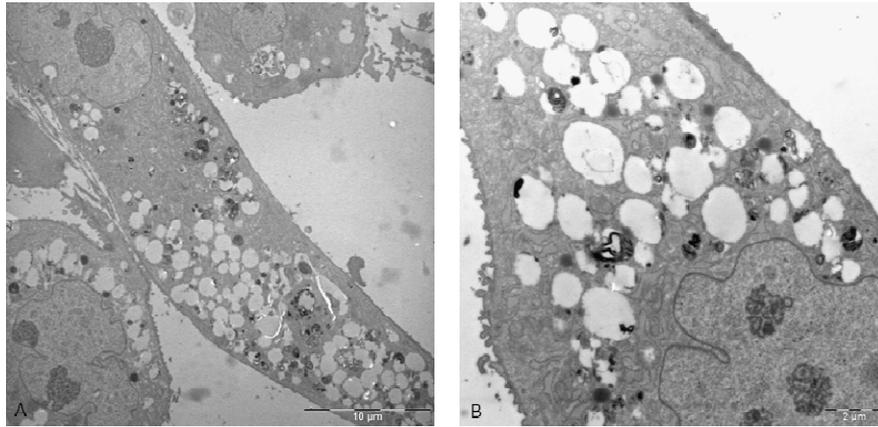


Figura 20. ME de las células TBL cultivadas con M1 (A-B).

Caracterización

Caracterización molecular

Se realizó la determinación de marcadores de pluripotencia (OCT4, NANOG, SOX2) y de marcadores de la línea germinal (VASA, DAZL) por PCR de las TBLs 1-10. Inicialmente se extrajo el RNA de las muestras a partir de 100.000 células y se hizo la RT-PCR como se indica en el apartado *Materiales y Métodos*. Los resultados fueron positivos para marcadores de pluripotencia (OCT4, NANOG, SOX2) (**Figura 21**), levemente positivos para STELLA pero negativos para marcadores de la línea germinal (VASA y DAZL) (**Figura 22**).

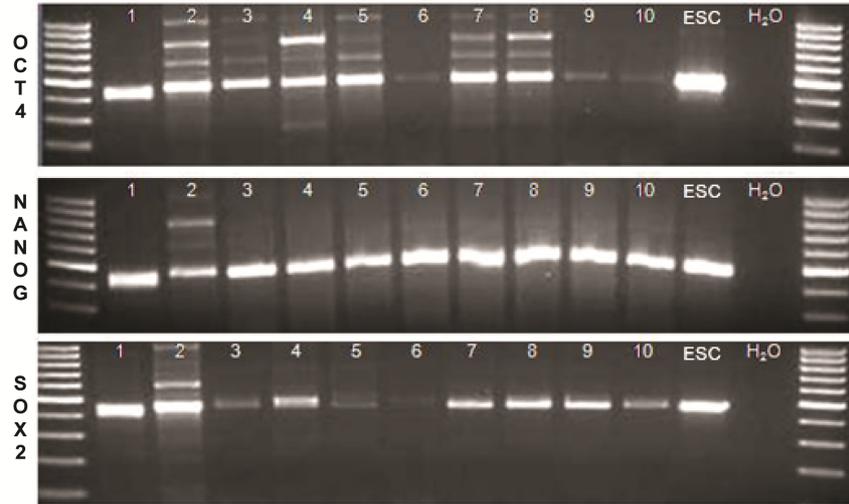


Figura 21. Marcadores de pluripotencia (OCT4, NANOG, SOX2) determinados por RT-PCR en las TBLs: 1-10 (TBLs), ESC (Control+), H₂O (Control – de la técnica).

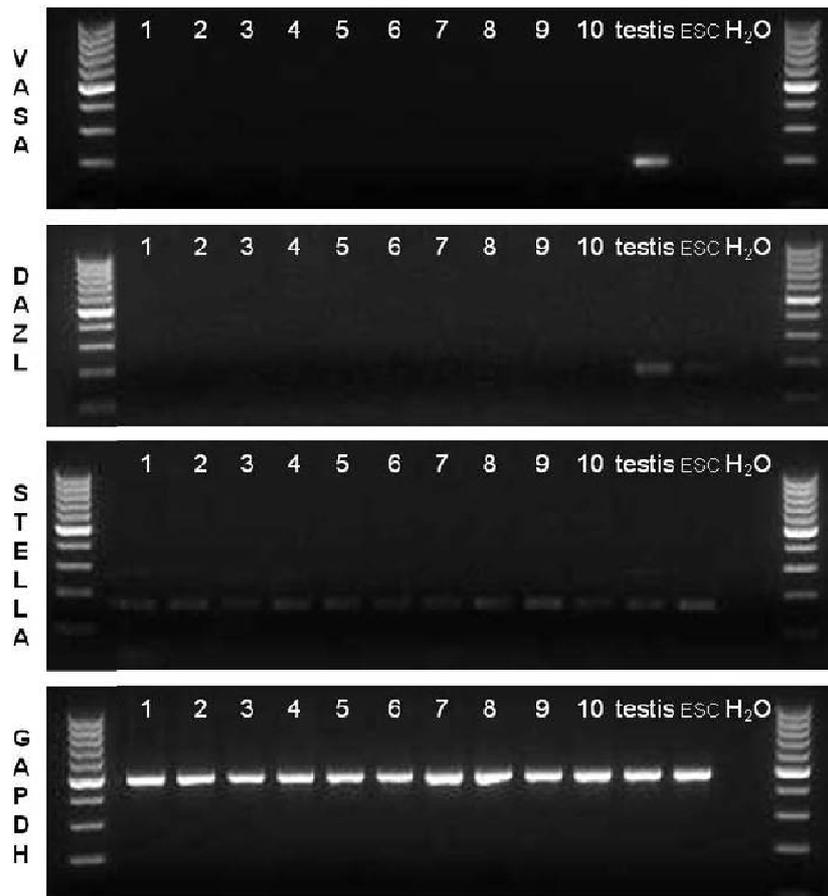


Figura 22. Marcadores de la línea germinal (VASA, DAZL, STELLA) y el GAPDH (control interno) determinados por RT-PCR en las TBLs: 1-10 (TBLs), Testis (Control +), ESC (Control-), H₂O (Control – de la técnica).

Debido a la no detección de los marcadores de células germinales en las líneas analizadas, se aplicó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR). Todas las líneas TBLs presentaban diferentes grados de expresión de los genes STELLA, FRAGILIS, VASA y DAZL, aunque de una forma

inestable al compararse con un testículo normal (control: Testis)
(Figura 23).

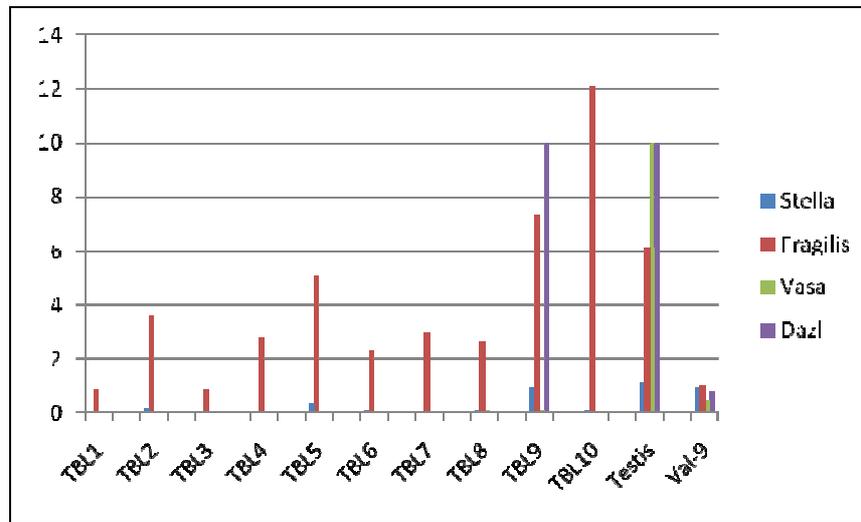


Figura 23. Expresión cuantitativa de marcadores de la línea germinal en las TBLs determinadas por qPCR.

Caracterización fenotípica

La inmunocitoquímica para la expresión de CD49f en las células de las líneas TBL1-10 demostró la expresión positiva en todas las líneas tras 7 semanas en cultivo (**Figura 24**).

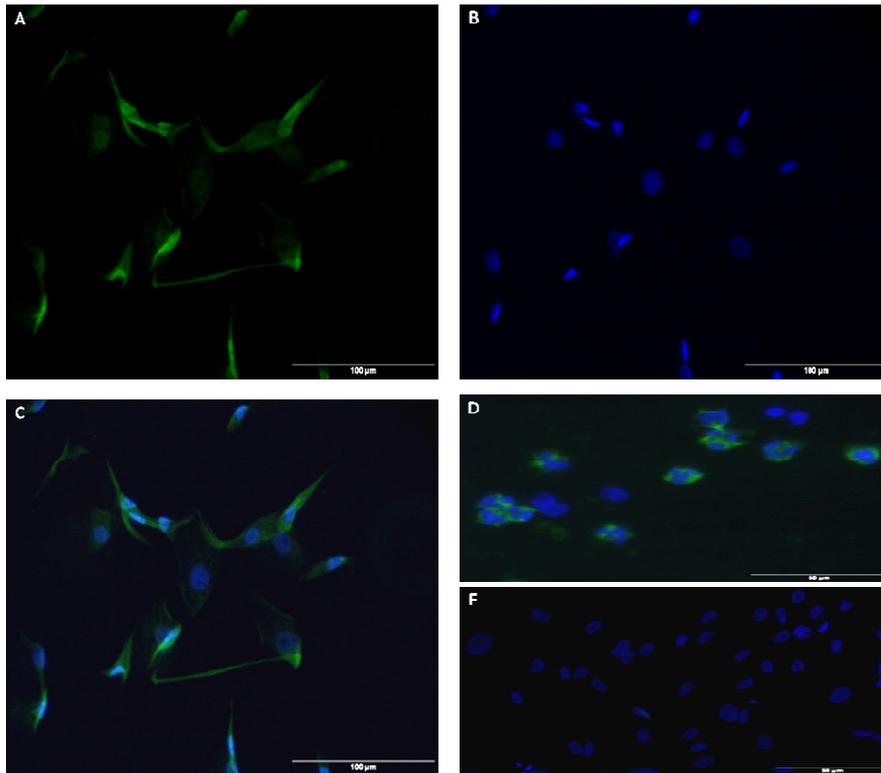


Figura 24. Expresión de CD49f en las células cultivadas con M1 en la TBL5: CD49f (A), DAPI (B), CD49f+DAPI (C), Control + (linfocitos humanos) (D) y Control – (células mesenquimales humanas) (E).

Análisis citogenético

La estabilidad genética de las TBL1-10 en cultivo fue analizada mediante la determinación del cariotipo por análisis de bandas G en diferentes pases, demostrando que las líneas mantenían un cariotipo normal de sus células a lo largo del tiempo en cultivo (**Figura 25**).

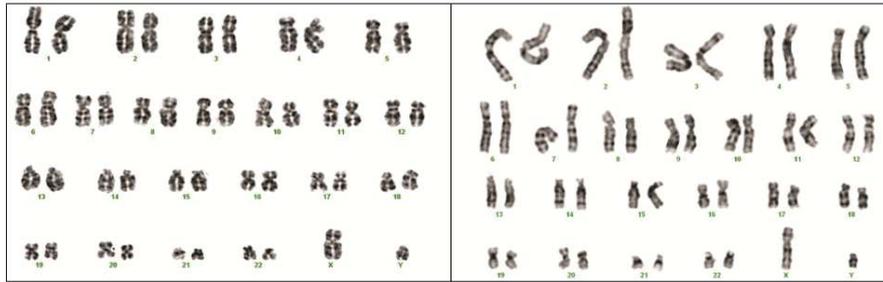


Figura 25. Cariotipo normal (46 XY) de las líneas TBL3 (A) y TBL5 (B).

Detección de la Actividad Telomerasa

Una de las características presente en las células pluripotentes es la presencia de actividad telomerasa, cuya actividad puede ser evaluada a través de qPCR. Tal y como se aprecia en la **figura 26**, en las TBLs obtenidas no fue detectada actividad de telomerasa compatible con inmortalidad.

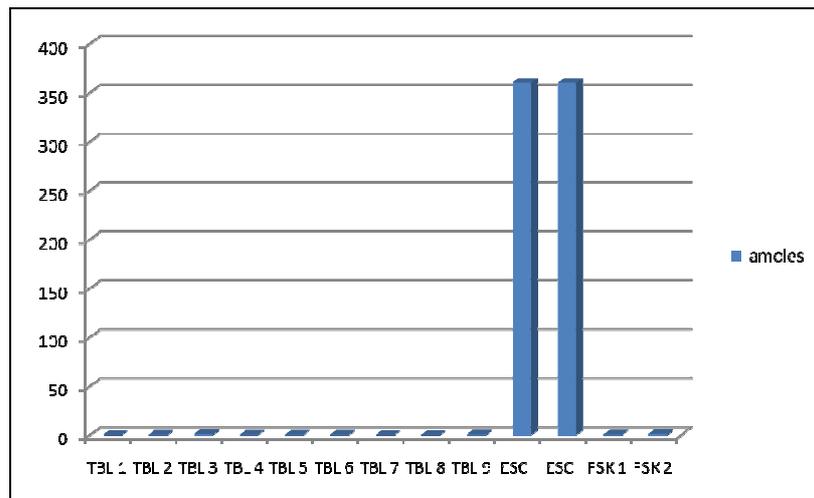


Figura 26. Determinación cuantitativa de la actividad Telomerasa. Muestras: TBL 1-9, ESC (control positivo), FSK 1-2 (control negativo).

Diferenciación *in vitro*

La diferenciación *in vitro*, mediante la formación de cuerpos embrioides (EBs) se realizó de 2 formas diferentes:

1. Diferenciación espontánea: los EBs se formaron en placas de baja adhesión y posteriormente fueron transferidos a placas gelatinizadas y cultivados durante 10 días más con medio rico en SBF específico para la diferenciación germinal (indicados en el apartado *Materiales y Métodos*). Tan solo de la línea TBL7 se obtuvieron células que resultaron positivas para inmunocitoquímica frente a β -III Tubulina (ectodermo) y Actina Muscular (mesodermo) (**Figura 27**).
2. Diferenciación dirigida: tras los 7 días en cultivo, los EBs fueron transferidos a placas recubiertas con gelatina y cultivados con los medios correspondientes para cada capa germinal (indicados en el apartado *Materiales y Métodos*) durante 10 días más. Algunas células de las líneas TBL 4, 7 y 10 resultaron positivas para inmunocitoquímica frente a Actina Muscular (mesodermo) (**Figura 27**).

Se realizó el mismo experimento con células madre embrionarias humanas (VAL-9) como control positivo de la técnica dando lugar a células diferenciadas de ectodermo, mesodermo y endodermo.

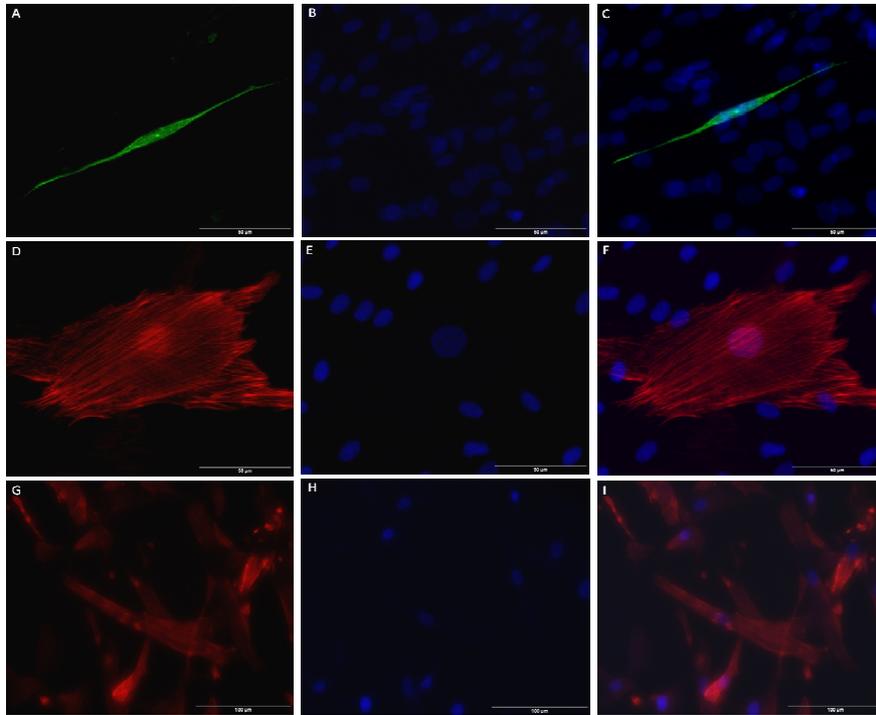


Figura 27. Diferenciación espontánea de la línea TBL7 (A-F) positiva para inmunocitoquímica frente a: β -III Tubulina (A,B,C) y Actina Muscular (D,E,F). Diferenciación dirigida de la línea TBL10 (G-I) positiva para inmunocitoquímica frente a Actina Muscular.

Diferenciación *in vivo*

La diferenciación *in vivo* se realizó mediante la inyección intratesticular de 500.000 células de las líneas TBL 3 a TBL 8 en ratones inmunodeprimidos SCID. Transcurridas 8 semanas se sacrificaron los ratones y no se observó formación de teratomas. Los testículos de los ratones fueron analizados mediante anatomía patológica. Como control de la técnica empleada, se inyectaron 30 colonias de células madre embrionarias humanas (VAL-9), las cuales sí dieron lugar a la formación de teratomas.

Por lo tanto, las 10 TBLs obtenidas de las 35 BTs procesadas demostraron la existencia de un fenotipo celular mesenquimal, la ausencia de marcadores de células germinales, actividad telomerasa incompatible con inmortalidad, la no capacidad de diferenciación a las 3 capas germinales y la no formación de teratomas. Todo ello demuestra que este protocolo produjo líneas celulares mesenquimales multipotentes. Estos resultados coinciden con el estudio publicado en *Nature* por el grupo de Scholer (Ko et al., 2010) poniendo en entredicho lo publicado previamente por el grupo de Skutella (Conrad, Renninger et al. 2008).

3.2 Protocolos modificados (M2 y M3)

Tras el fallo inicial en la obtención de SSC desde BTs con el protocolo de Conrad, realizamos una adaptación de los protocolos con los medios M2 y M3 que probamos en 10 nuevas muestras de BTs. Las células CD49f+ aisladas de estas 10 muestras en el citómetro de flujo fueron sembradas directamente con los 2 medios de cultivo (M2 y M3) (descritos en el apartado *Materiales y Métodos*), dando lugar a la aparición de agregados y racimos celulares respectivamente en todas las nuevas muestras (**Figura 28**).

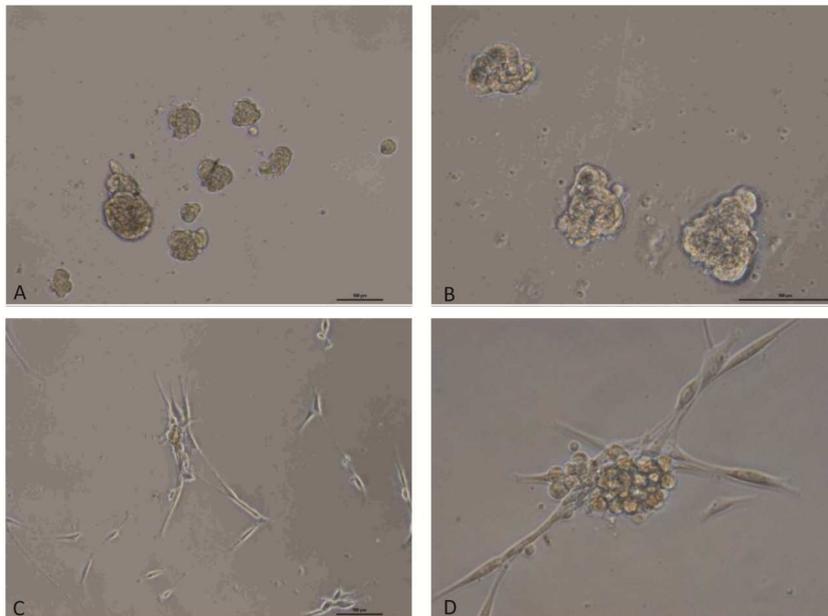


Figura 28. Visualización de los diferentes fenotipos celulares obtenidos de las CD49f+ en cultivo con los medios M2 y M3 (A-B:M2, C-D:M3).

Caracterización

Los resultados moleculares para los marcadores de la línea germinal se presentan en la tabla IX e indican la positividad para BOULE y BLIMP-1 así como SCP3 como marcador meiótico.

Tabla IX: Expresión de marcadores de línea germinal correspondiente a las diferentes condiciones de cultivo, determinados por RT-PCR.

Marcadores	M2	M3	
THY-1	+	+	→ Indiferenciación/ Pluripotencialidad
GAF	-	-	→ Receptor GDNF/ Nicho testicular
C-KIT	-	-	} Fase Premeiótica
DAZL	-	-	
VASA	-	-	
STELLA	-	+	
PIWILL2	-	-	
BOULE	+	+	} Fase Meiótica
DCM1	-	-	
SCP3	+	+	
PRM1	-	-	} Fase Post-meiótica
TNP2	-	-	
BLIMP1	+	+	→ PGC
GAPDH	+	+	

Con la finalidad de corroborar los datos obtenidos por RT-PCR (**Figura 29**) la expresión de los marcadores SCP3, BOULE, BLIMP1 fueron identificados mediante qPCR (**Figura 30**).

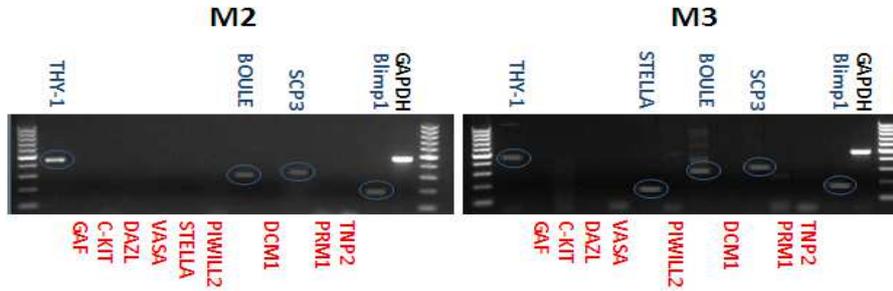


Figura 29. Expresión de marcadores de línea germinal determinados por RT-PCR en células CD49f+ en diferentes condiciones de cultivo.

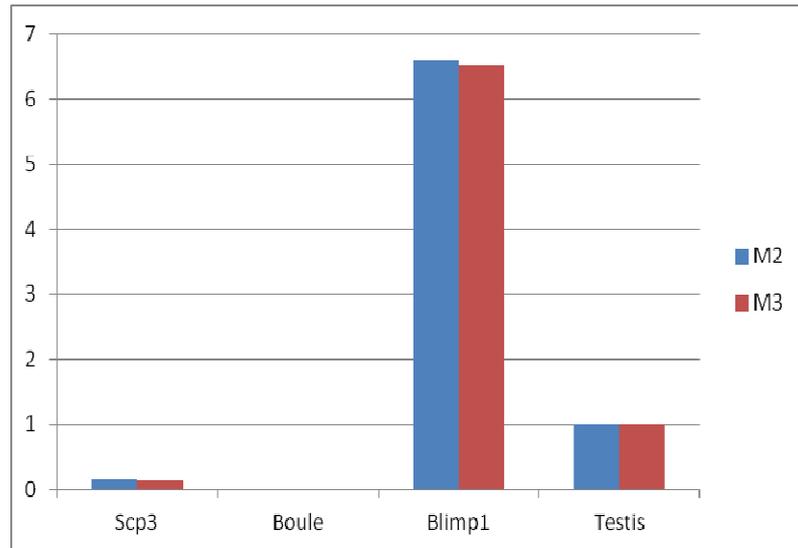


Figura 30. qPCR de las células procedentes de los medios de cultivo M2 y M3.

Aunque los resultados moleculares fueron similares, el cultivo de células CD49f+ con el medio M2 determinaba la aparición de agregados celulares, “clusters” con los que se podía trabajar mejor por lo tanto nos centramos en este protocolo.

Análisis Inmunocitoquímico

El análisis inmunocitoquímico de los agregados celulares formados con el uso del medio M2 demostró que eran positivos para CD49f, THY-1, GPR125, CD133 y SSEA-4, y negativos para VASA (**Figura 31**).

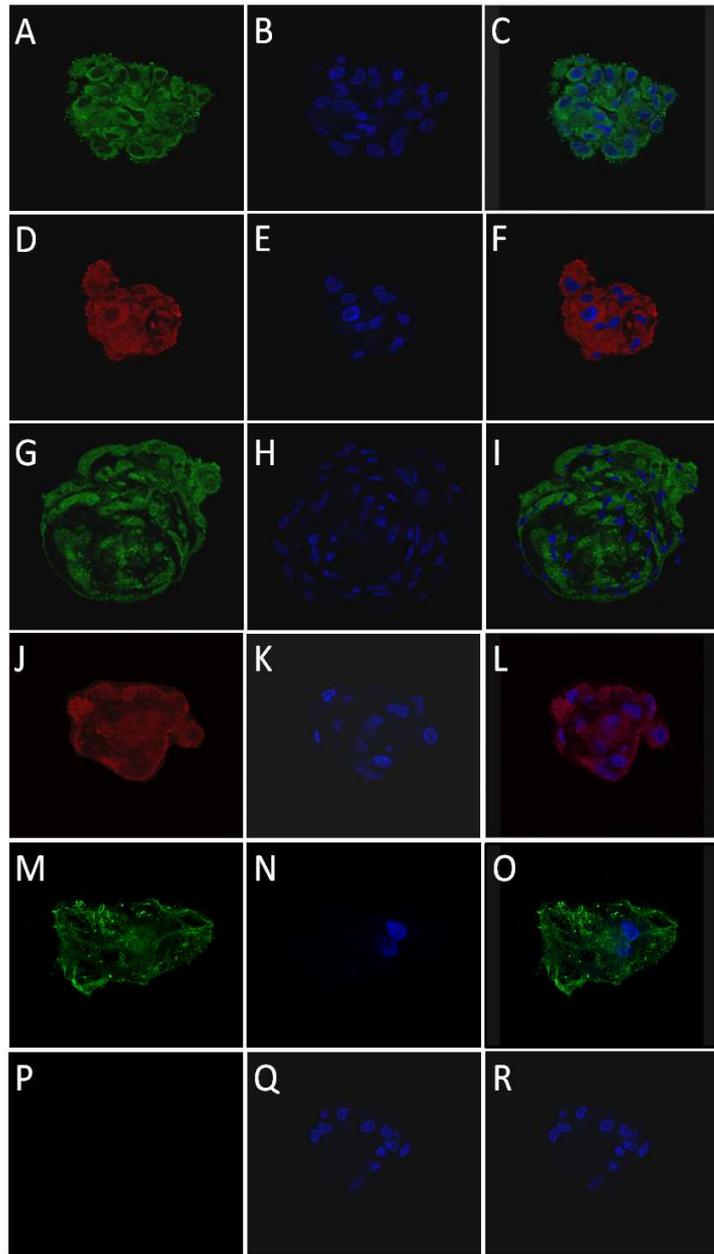


Figura 31. Inmunocitoquímica de las células CD49f+ cultivadas en M2 (A-C: CD49f+, D-F: THY-1, G-I: GPR125, J-L: CD133, M-O: SSEA-4, P-R: VASA; B,E,H,K,N,Q: DAPI y C,F,I,L,O,R: merge).

Microscopia Electrónica (ME)

La ME demostró que los agregados celulares formados en cultivo presentaban una gran actividad mitocondrial, con presencia de retículo endoplasmático rugoso (RER) y matriz extracelular (**Figura 32**).

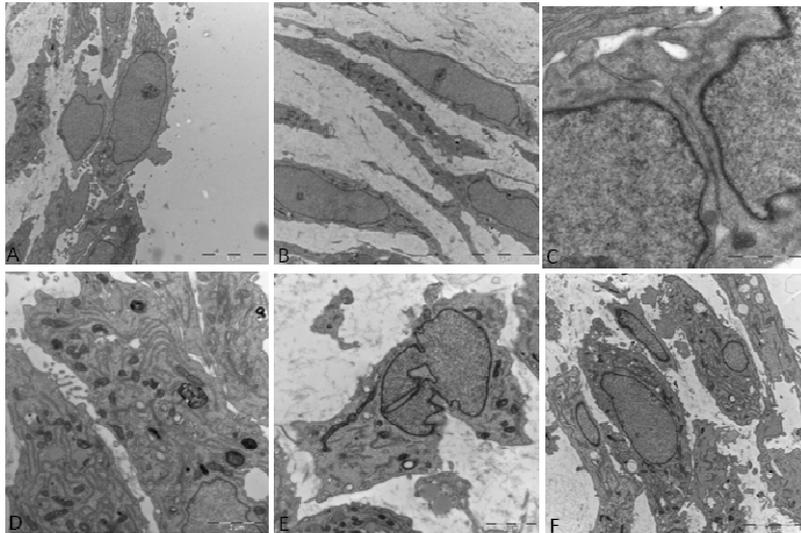


Figura 32. ME de los agregados celulares en M2 (A-B: formación de matriz extracelular; D,F: mitocondrias y RER ;C,E: morfología celular).

Con estos resultados, se procedió a la maduración *in vitro* de las células obtenidas. Para ello, se decidió utilizar un protocolo de co-cultivo celular de las células CD49f+ aisladas en el citómetro de flujo con células de Sertoli.

4. Co-cultivo de las células CD49f+ con células de Sertoli

Las 20 últimas BTs recogidas en éste estudio fueron destinadas para los experimentos de maduración *in vitro*. Para empezar el co-cultivo, fue necesario crear una línea de células de Sertoli, la cual fue obtenida a partir de 5 BTs humanas siguiendo el protocolo explicado en el apartado de *Materiales y Métodos*.

El fenotipo de las células de Sertoli fue verificado tras tripsinización e incubación con rojo nilo y su aislamiento posterior mediante citometría de flujo (**Figura 33**).

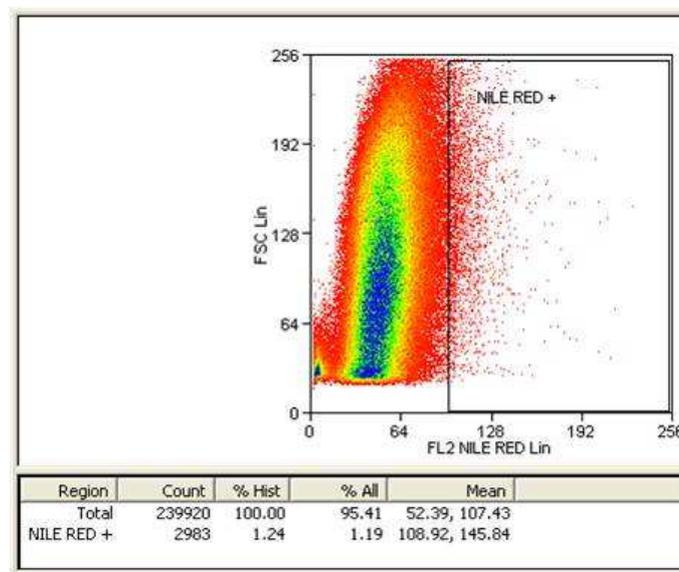


Figura 33. Aislamiento de Células de Sertoli con marcaje con rojo nilo (nile red) mediante citometría de flujo.

Las células de Sertoli separadas fueron sembradas en placas con matriz de colágeno y mantenidas en cultivo (**Figura 34**).

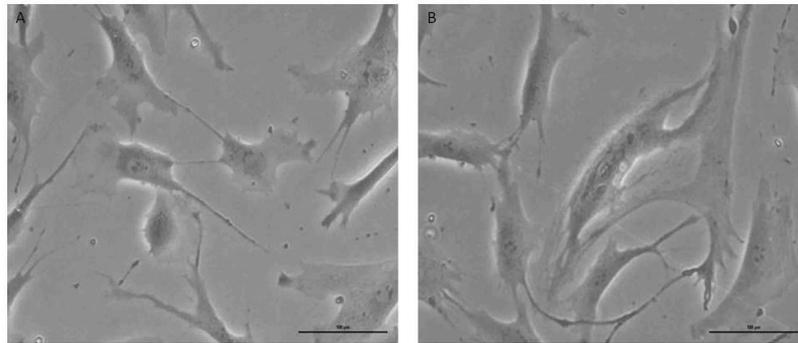


Figura 34. Cultivo de las células de Sertoli purificadas con rojo nilo (P2).

4.1 Caracterización de la línea de células de Sertoli

El resultado de la RT-PCR demostró la presencia de marcadores característicos de las células de Sertoli como son el receptor de GDNF (GAF), stem cell factor (SCF) y los factores de transcripción GATA-4 y Wilms tumor (WT-1) (**Figura 35**).



Figura 35. Expresión de marcadores específicos de las células de Sertoli (positivo: GAF, SCF, GATA-4, WT-1 y GAPDH; negativo: rFSH y SOX-9).

Mediante ME se pudieron visualizar la existencia de gotas lipídicas así como *tight junctions* propias de estas células de Sertoli (**Figura 36**).

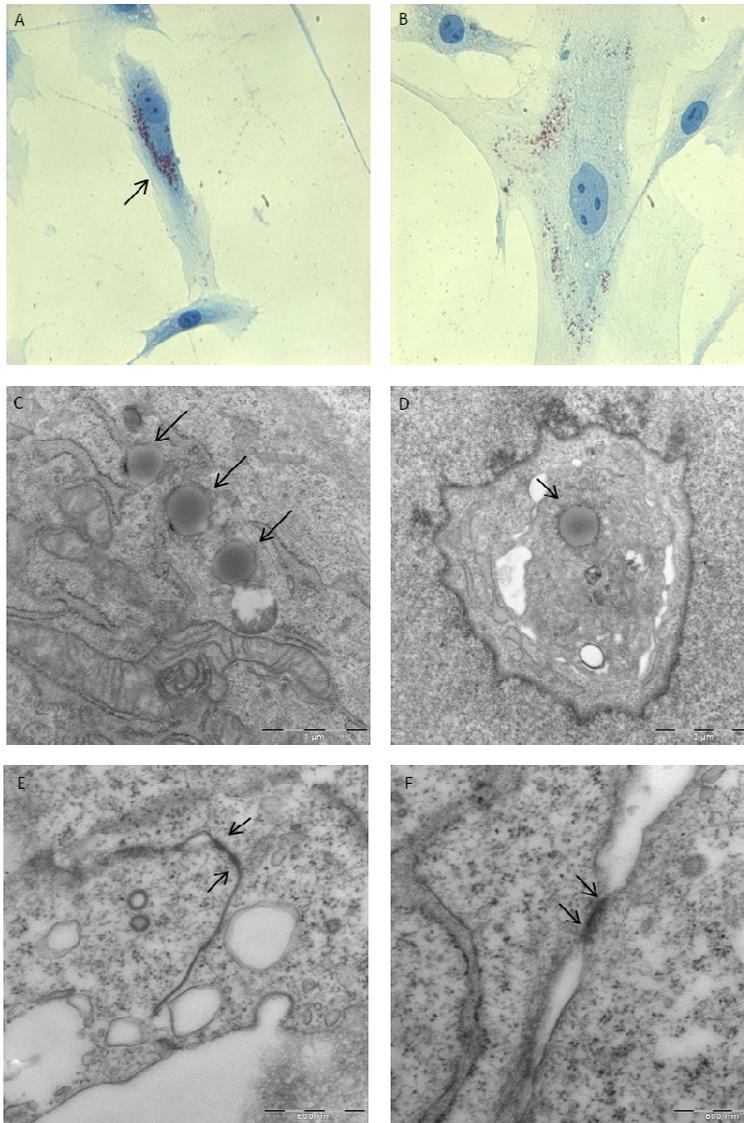


Figura 36. Tinción de oil red (A-B), presencia de gotas lipídicas (C-D) y presencia de “tight junctions” (E-F) en las células de Sertoli.

El análisis inmunohistoquímico demostró la expresión de Gata-4 y Vimentina inmunoreactiva en este tipo celular (**Figura 37**).

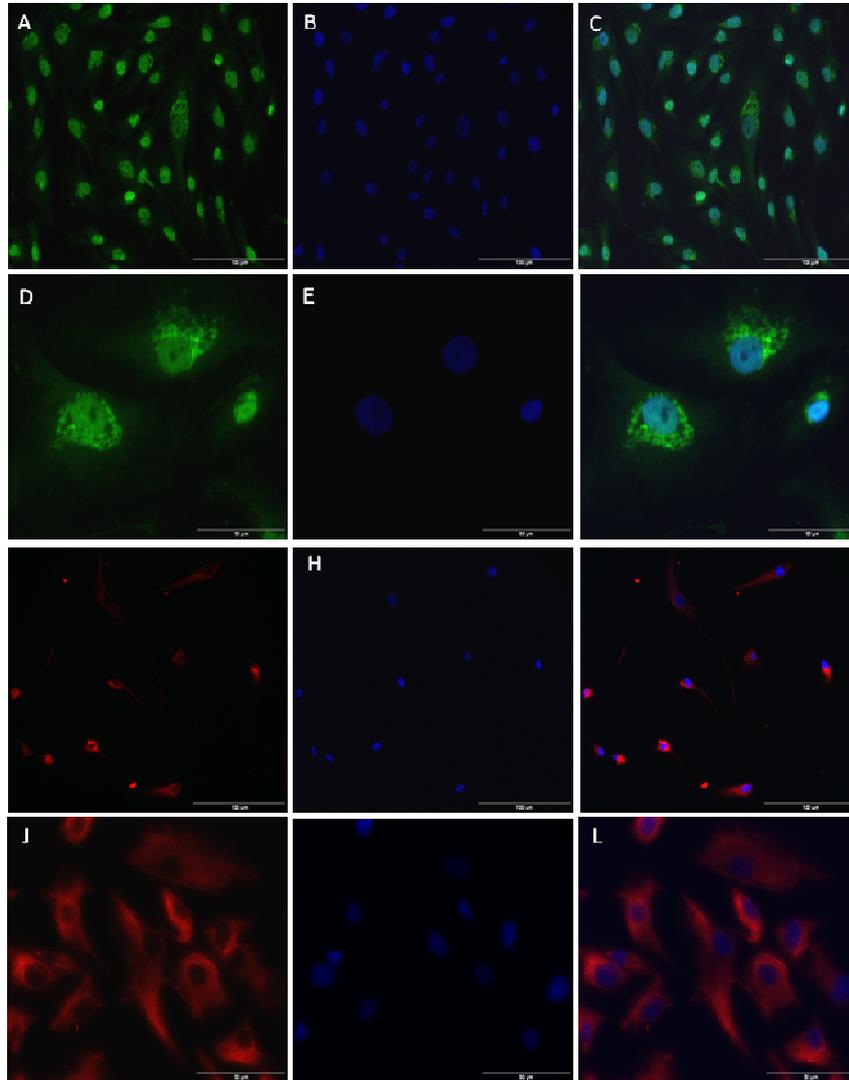


Figura 37. Análisis inmunocitoquímica para la expresión de GATA-4 (A,D: GATA-4; B,E: DAPI; C,F: Gata-4/DAPI) y Vimentina (G,J: Vimentina; H,K: DAPI; I,L: Vimentina/DAPI) en las células de Sertoli.

4.2 Transfección de las células de Sertoli con RFP

Tras su caracterización, las células de Sertoli fueron sembradas, cultivadas y transfectadas con la proteína RFP según está descrito en el apartado *Materiales y Métodos*. La eficiencia del método se comprobó mediante fluorescencia (**Figura 38**).

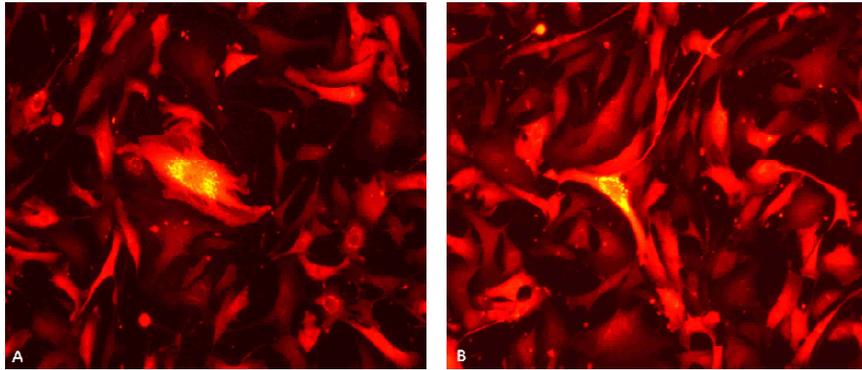


Figura 38. Células de Sertoli transfectadas con RFP.

4.3 Maduración *in vitro*

Las células de Sertoli-RFP fueron sembradas en placas con matriz de colágeno y se inició el co-cultivo con las células CD49f+ utilizando un medio de cultivo con presencia del factor GDNF, AR, FSH y T según dosis indicadas en el apartado *Materiales y Métodos*. Se realizó un *time-course*, durante 3, 5, 7 y 10 días. En cada punto se recogieron

las células y se analizaron por FISH e inmunocitoquímica para los marcadores de la meiosis de las células obtenidas.

De las 20 BTs procesadas en este apartado, 11 procedían de AS y 9 de AO. De ellas, 6 fueron descartadas debido a la presencia de contaminación microbiana y en otras 2 no se obtuvieron células CD49f+, por lo que 12 muestras de CD49f+ pudieron ser finalmente co-cultivadas con células de Sertoli.

Para conocer las condiciones basales, antes de empezar el co-cultivo, 1.500 células CD49f+ y células de Sertoli-RFP fueron estudiadas cromosómicamente mediante FISH y mediante inmunocitoquímica para diversos marcadores de meiosis. Los resultados obtenidos demostraron que todas las células CD49f+, así como las células de Sertoli, eran diploides independientemente de su procedencia (AO o AS). Por otra parte, mediante estudio por inmunocitoquímica de la meiosis, se observaron marcadores de células en estadio de paquitenio y presencia de CREST positiva (**Figura 39**).

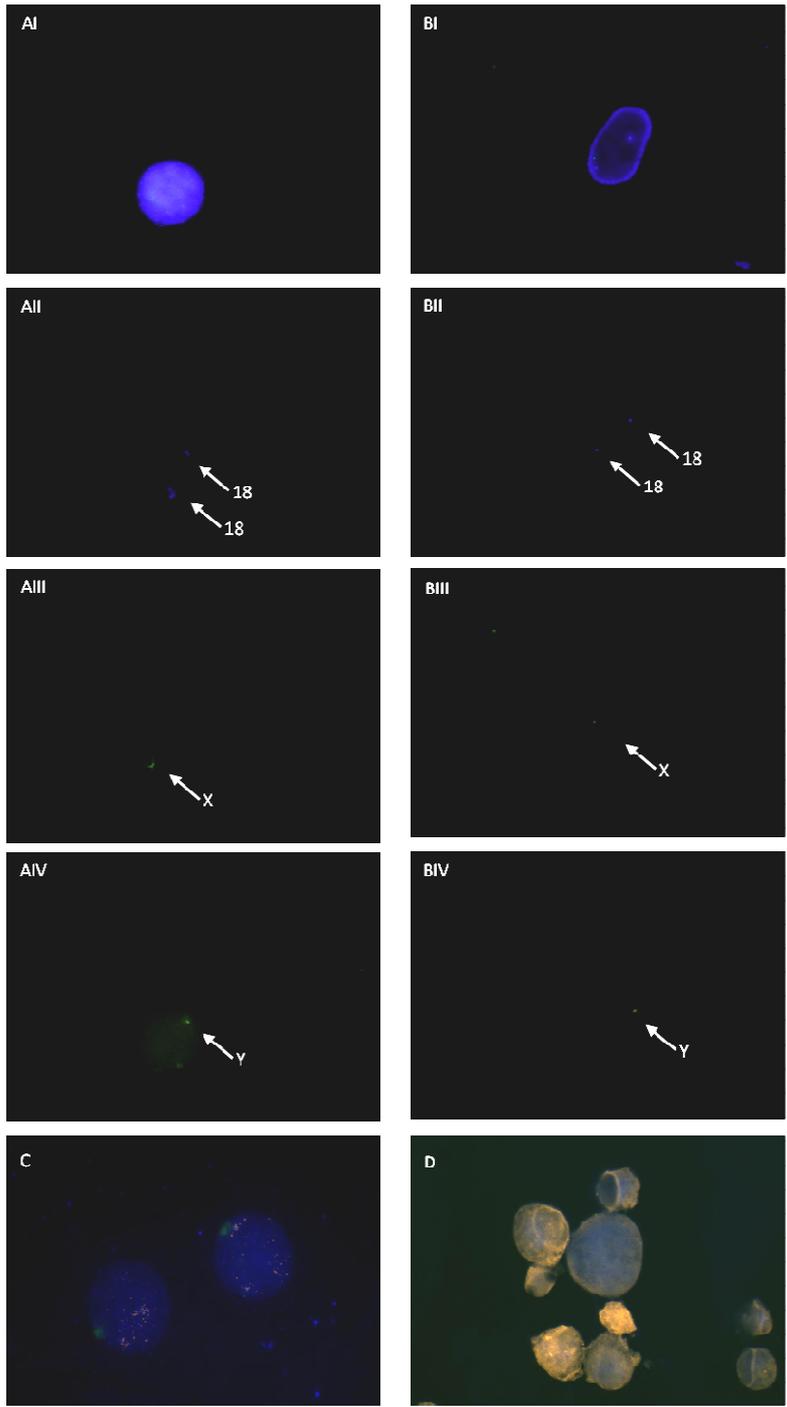


Figura 39. Análisis por *FISH*: A) células CD49f+ (I) dapi, (II) presencia de 2 cromosomas 18, (III) presencia de 1 cromosoma X, (IV) presencia de 1 cromosoma Y; B) células de Sertoli-RFP (I) dapi, (II) presencia de 2 cromosomas 18, (III) presencia de 1 cromosoma X, (IV) presencia de 1 cromosoma Y; C) inmunofluorescencia para la etapa de la *meiosis* (*SCP3*, *MLH1* Y *CREST*) de las células CD49f+ ausencia de marcaje y D) inmunofluorescencia para la etapa de la *meiosis* de las células de Sertoli-RFP ausencia de marcaje.

Tras el análisis de los controles celulares, de modo ciego, tanto de las células CD49f+ como de las células de Sertoli-RFP, para todas las muestras co-cultivadas, se procedió la observación de las células recogidas durante el time-course. El estudio cromosómico mediante la técnica de *FISH* de las células CD49f+ co-cultivadas con las células de Sertoli-RFP, durante 5 días, demostró la aparición de células haploides (1n) procedentes de una BT de paciente con diagnóstico de AS, observando una única señal para las sondas de los cromosomas 13, 18, 21, X, Y (**Figura 40**). En días 3, 7 y 10 de co-cultivo, sólo se observaron células diploides (2n).

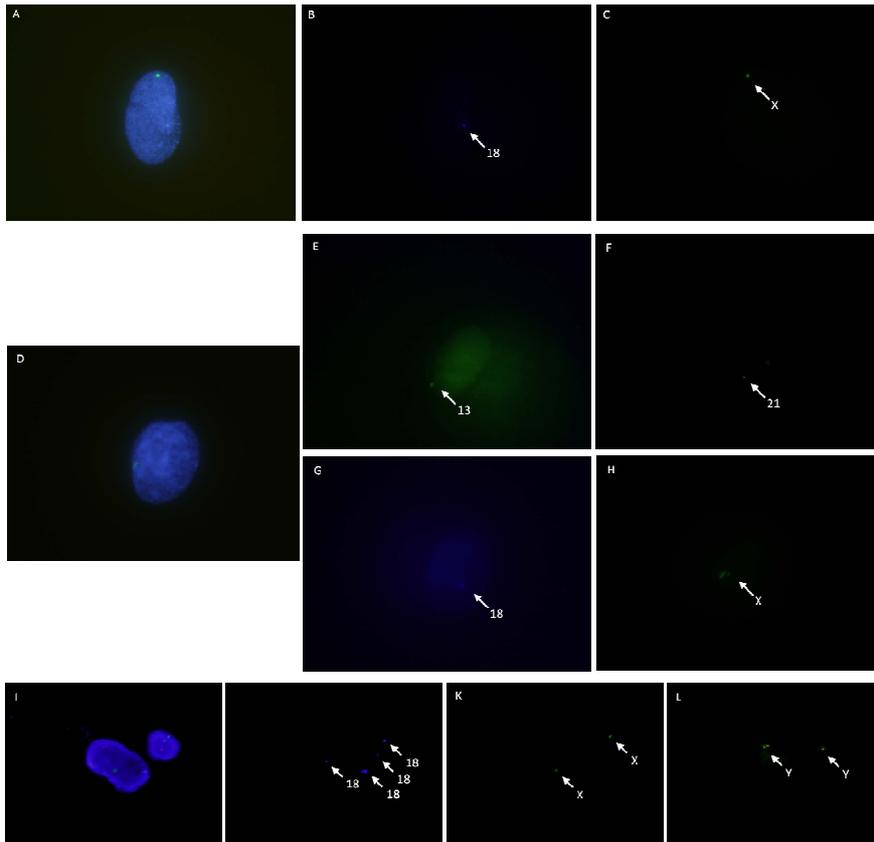


Figura 40. Análisis por FISH tras 5 días de co-cultivo. Célula CD49f+ haploide (A: DAPI, B: presencia de un solo cromosoma 18, C: presencia de un solo cromosoma X). Célula CD49f+ haploide (D: DAPI, E: presencia de un solo cromosoma 13, F: presencia de un solo cromosoma 21, G: presencia de un solo cromosoma 18, H: presencia de un solo cromosoma X). Células CD49f+ con células de Sertoli-RFP diploides (I: DAPI, J: presencia de 4 cromosomas 18, K: presencia de 2 cromosomas X, L: presencia de 2 cromosomas Y).

El análisis inmunocitoquímico de las biopsias co-cultivadas, demostró la aparición de los marcadores SCP3 y CREST en los días 3 y 5 implicando que estas células pudieran entrar en proceso de meiosis en los primeros estadios de paquiteno y zigoteno (**Figura 41**).

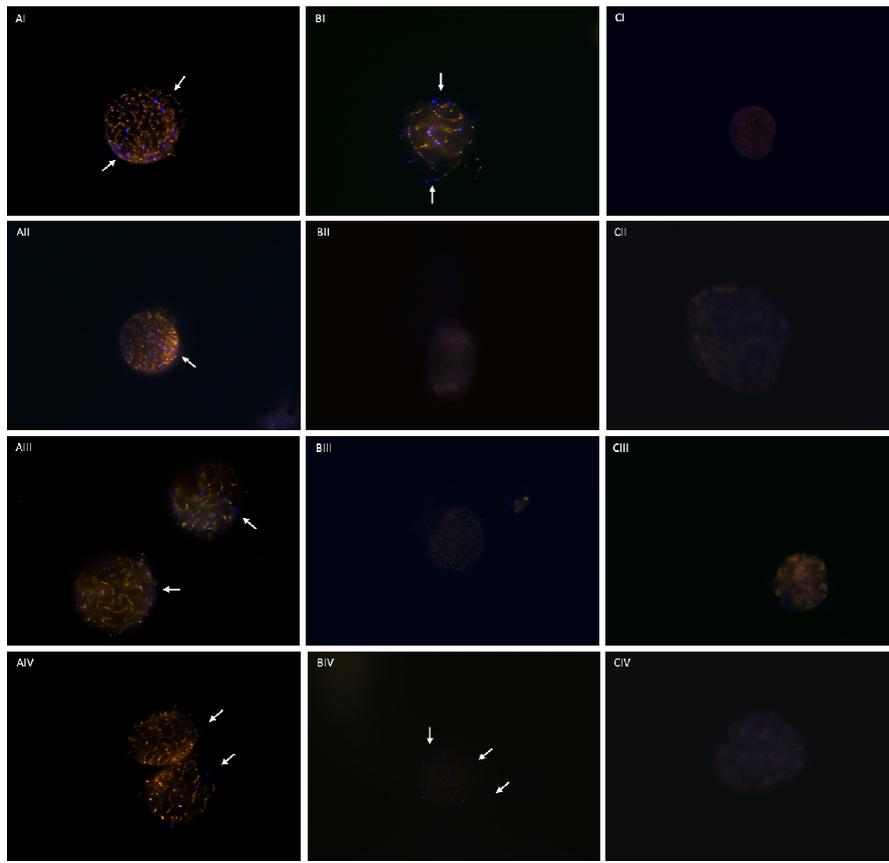


Figura 41. Inmunocitoquímica de las etapas de la meiosis en las células co-cultivadas de pacientes con AS. Día 3 (AI-IV: presencia de SCP3 y CREST representando el estadio de zigoteno); Día 5 (BI-IV: presencia de SCP3 y CREST representando el estadio de zigoteno); Día 7 (CI-IV: ausencia de marcaje).

En las muestras de AO mantenidas en co-cultivo, no se detectaron células haploides ($1n$). Sin embargo, el resultado de inmunocitoquímica para SCP-3 y CREST reveló la presencia de un

pequeño número de células positivas en paquiteno en los días 3 y 5 (Figura 42).

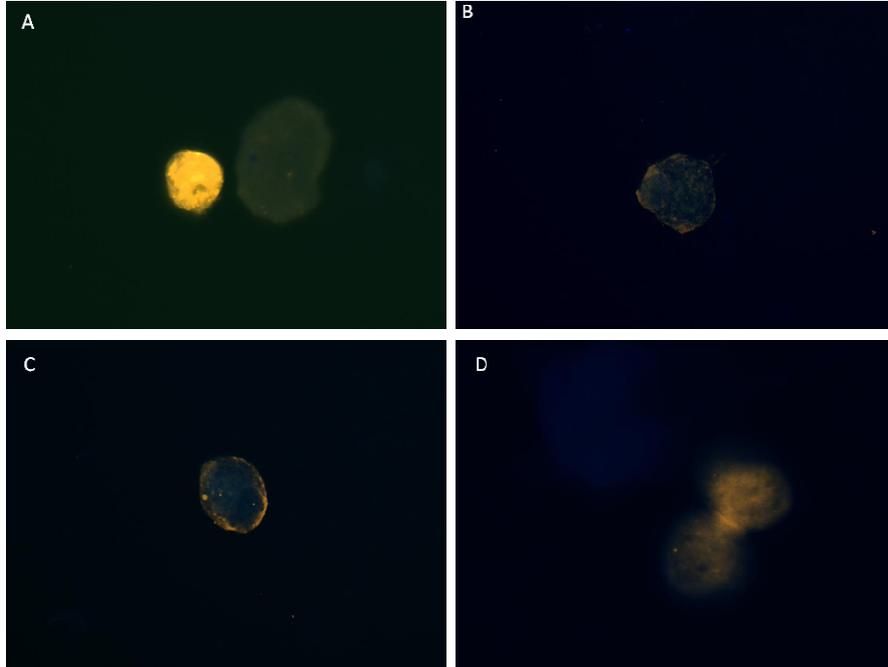


Figura 42. Inmunocitoquímica de las etapas de la meiosis en distintos días de co-cultivo en muestras de pacientes AO (A: ausencia de marcaje en día 3; B-C: ausencia de marcaje en día 5; D: ausencia de marcaje en día 7).

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

En los últimos años, la demanda en los tratamientos de infertilidad por parte de parejas que poseen alguna dificultad en la concepción, se ha incrementado. Analizando los motivos que originan los problemas de infertilidad, la presencia del factor masculino es responsable en cerca del 40% de los casos debido a diversas causas como la azoospermia secretora y obstructiva siendo necesaria en estos casos la realización de biopsias testiculares para la obtención de espermatozoides que posteriormente serán utilizados para el procedimiento de fertilización *in vitro*.

En pacientes con azoospermia obstructiva, donde existe una obstrucción de los conductos que no permite la salida de los espermatozoides durante la eyaculación, la biopsia testicular soluciona en parte los problemas de infertilidad, ya que estos pacientes sí que poseen espermatozoides y pueden ser utilizados para la fecundación a través de las técnicas de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Palermo, Joris et al. 1992).

Sin embargo, en pacientes con azoospermia secretora habitualmente no existen espermatozoides disponibles, por lo que estas parejas tienen como única posibilidad la donación de gametos. Esta patología se puede deber a numerosas causas como problemas en el desarrollo testicular, inflamaciones testiculares, traumatismos testiculares,

problemas hormonales, genéticos y tratamientos quimioterápicos o radioterápicos. Nos encontramos así con el caso de jóvenes prepuberales que han padecido algún tipo de cáncer y han pasado por tratamientos de quimioterapia o radioterapia y en los que la realización de una biopsia testicular antes o después del tratamiento no va a solucionar su futuro reproductivo debido, por un lado, a las limitaciones endocrinas y fisiológicas de los testículos inmaduros en la pubertad y por otro lado, al efecto destructivo de la terapia oncológica. Estos varones quedarán estériles para toda la vida, no disponiendo actualmente de otra alternativa para tener sus propios descendientes biológicos (Howell and Shalet 2001, Wyns, Curaba et al. 2010).

Para la preservación de la fertilidad en estos jóvenes, se ha propuesto el almacenamiento de tejido testicular antes del tratamiento oncológico (Tournaye, Goossens et al. 2004). Pero no se ha podido demostrar que su descongelación y cultivo pudiese dar lugar a la diferenciación de espermatozoides con esperanzas de que en un futuro, sea posible su uso clínico.

En estudios recientes, se ha demostrado la posibilidad de aislar células con propiedades pluripotentes desde un testículo humano adulto (Conrad, Renninger et al. 2008, Golestaneh, Kokkinaki et al. 2009, Sadri-Ardekani, Mizrak et al. 2009, He, Kokkinaki et al. 2010, Mizrak, Chikhovskaya et al. 2010). Dichas células fueron purificadas mediante la utilización de anticuerpos frente a moléculas y matrices

extracelulares, posteriormente cultivadas, expandidas y mantenidas *in vitro*. Además, las células eran capaces de auto-renovarse y diferenciarse, manteniendo sus características germinales y pluripotentes de origen (Guan, Wolf et al. 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que el nicho testicular es mantenido fundamentalmente por GDNF (factor neurotrófico derivado de células gliales), el cual es un factor esencial que permite la proliferación y favorece la auto-renovación de las Spermatogonial Stem Cells (SSC) en cultivo (de Rooij 2009). Las concentraciones utilizadas de éste factor varían desde 4ng/ml para el mantenimiento de las SSC hasta entre 20 y 100ng/ml para la supervivencia y proliferación celular (Conrad, Renninger et al. 2008, Hofmann 2008, Guan, Wolf et al. 2009).

En esta tesis doctoral, se aborda el aislamiento y caracterización de SSCs a partir de tejido testicular biopsiado (BT) de forma rutinaria en pacientes con AO o AS que se encuentran en estudio/tratamiento de su problema de infertilidad. En las 35 primeras BTs se ha utilizado una concentración de GDNF de 4ng/ml de acuerdo al protocolo de Conrad *et al.* (2008) (Conrad, Renninger et al. 2008). Cabe resaltar que en esta publicación, las células pluripotentes son obtenidas a partir de testículos completos donados por personas fallecidas y no de fragmentos de biopsia testicular como en nuestro caso, lo que hace pensar que la utilización de todo el tejido testicular puede proporcionar las condiciones ambientales *in vivo* del nicho

favoreciendo la obtención de células pluripotentes. En nuestro estudio, trabajamos con fragmentos de biopsias testiculares que pueden o no tener células que forman parte del nicho, ya que solo algunas áreas del testículo proporcionan los factores responsables para la conservación del ambiente necesario para mantener las SSCs (de Rooij 2009). El concepto de nicho nos sugiere que existe una gran interacción entre las células somáticas y las SSCs, por lo que fuentes internas y externas proporcionan las señales ambientales que influyen en el destino que la SSC debe tomar (mantenerse o diferenciarse) (Caires, Broady et al. 2010).

La utilización de anticuerpos capaces de marcar la membrana o el citoplasma celular de una determinada población para que ésta sea purificada posteriormente, es la técnica más satisfactoria para la obtención de una población homogénea. El antígeno de superficie CD49f que está presente en todas las células que se encuentran en la membrana basal de los túbulos seminíferos, es el marcador utilizado en protocolos de purificación (Conrad, Renninger et al. 2008), identificando todos los tipos y subtipos de espermatogonias, espermatoцитos primarios y células de Sertoli (Golestaneh, Kokkinaki et al. 2009). Éste marcador selecciona diversos tipos celulares que representan el 1-2% del total de las células del testículo (de Rooij 2009). Actualmente, se ha demostrado que las SSC son positivas para CD49f (α 6-integrina), β 1-integrina, GFR- α 1, CD9, Thy-1 y EpCAM y negativas para c-Kit y SSEA-1 en diferentes especies (Oatley and

Brinster 2008). En humanos, las SSC son positivas para CD49f, GFR- α 1, Thy-1 y GPR125 (Conrad, Renninger et al. 2008, Kossack, Meneses et al. 2009, He, Kokkinaki et al. 2010). El uso de matrices extracelulares combinando la detección de colágeno y laminina para el aislamiento de las SSCs desde testículos de ratón, ha sido previamente descrito por Hamra *et al.* (2004) (Hamra, Schultz et al. 2004). Muchos estudios han sugerido que la laminina ejerce un papel crítico en la selección de células CD49f+ debido a que las SSCs aisladas poseen receptores para laminina y que el cultivo *in vitro*, en presencia de laminina, mantendría las interacciones del nicho necesarias para el buen desarrollo de las SSCs (Morimoto, Kanatsu-Shinohara et al. 2009).

En este estudio, siguiendo un protocolo de disgregación eficaz seguido de un paso de aislamiento, el porcentaje de células CD49f+ recuperadas con el citómetro de flujo, con respecto al total de células obtenidas tras la disgregación de las BTs en pacientes con azoospermias obstructivas y secretoras fue similar correspondiendo del 1 a 2% de la población celular total. En las muestras donde la espermatogénesis se encuentra preservada (AO) se ha podido aislar el doble de células que en las muestras con alguna patología que implica bloqueo o disfunción de la formación de los espermatozoides (AS).

A través de esa metodología ha sido posible la obtención de 10 líneas de biopsia testicular (TBL). El análisis molecular demostró que estas

líneas retenían marcadores de pluripotencialidad (OCT4, NANOG y SOX2,) por RT-PCR y qPCR, tal y como ha sido reportado en las SSCs (Conrad, Renninger et al. 2008).

La telomerasa es una enzima implicada en la síntesis de los telómeros (los extremos de los cromosomas) y niveles elevados de la misma están asociados con la inmortalidad de las células. En las líneas TBL 1-10 obtenidas, la actividad telomerasa no fue detectada lo cual puede ser debido al origen adulto del tejido testicular o al cultivo *in vitro* (Marion, Strati et al. 2009) o bien a que han perdido dicha actividad con los pases. Aunque se ha publicado la detección de actividad telomerasa positiva en SSCs, cabe destacar que la misma ha sido mucho más baja que en las ESC, presentando apenas una pequeña expresión (Golestaneh, Kokkinaki et al. 2009, Kossack, Meneses et al. 2009). La ausencia de marcadores de la línea germinal (VASA, DAZL y FRAGILIS) en dichas líneas, así como la existencia de un fenotipo celular mesenquimal, ausencia de actividad telomerasa y la incapacidad de diferenciación a las 3 capas germinales *in vitro* e *in vivo*, demuestra que este protocolo produjo líneas celulares mesenquimales multipotentes. Estos resultados coinciden con el estudio presentado en Nature del grupo de Scholer (Ko, Arauzo-Bravo et al. 2010) cuestionando los hallazgos inicialmente publicados por el grupo de Skutella (Conrad, Renninger et al. 2008).

Por tal motivo, la propuesta inicial del estudio, que era obtener células pluripotentes, fue modificada de modo que se pudiera

intentar empezar el proceso de maduración *in vitro* para inducir la meiosis y tratar de completar la espermatogénesis *in vitro*.

Para ello, una de las posibilidades era modificar el medio de mantenimiento celular con la intención de mantener las células CD49f aisladas con sus características de origen pluripotentes y además germinales, de modo que, se elevó la concentración de GDNF, ya que ha sido demostrado que un aumento en la dosis de dicho factor actúa sobre la auto-renovación de las SSC impidiendo su diferenciación (Meng, Lindahl et al. 2000, Sariola and Saarma 2003, Naughton, Jain et al. 2006, Oatley and Brinster 2006). Además, en el medio de cultivo, aparte de LIF, que es un factor que mantiene la pluripotencialidad, se incluyeron otros factores como bFGF, SCF, EGF o GFR α -1 para favorecer la proliferación y supervivencia de las SSCs (Oatley and Brinster 2006). Así mismo, se cambió el SBF por un medio libre de suero, ya que hay algunas publicaciones en las que se utiliza el medio KSR en diferentes concentraciones (Kanatsu-Shinohara, Ogonuki et al. 2003, Kanatsu-Shinohara, Toyokuni et al. 2004, Kanatsu-Shinohara, Miki et al. 2005) para mantener las células con el mayor grado de indiferenciación posible.

De esta forma, en 10 nuevas BTs se probaron distintos medios de cultivo y combinaciones de factores para la obtención de células que se mantuvieran indiferenciadas pero sin alterar su potencial germinal. Con algunos cambios en el protocolo de cultivo, modificando las placas de 6 a 48 pocillos y además utilizando 2

medios con diferentes composiciones, se ha podido crear un microambiente que ha dado lugar a 2 tipos morfológicos (clusters y racimos) con características particulares. Únicamente en uno de los medios de cultivo (M2) (apartado *Materiales y Métodos*) se ha conseguido generar aglomerados celulares con características pluripotentes (THY-1, SSEA-4) y germinales (CD49f, CD133, GPR125, BOULE) identificando además el marcador SCP3, sugiriendo señales de inducción de la meiosis en estas células y potenciando el marcador BLIMP1, el cual se expresa en las células primordiales germinales (PGC). Por otro lado, no ha habido expresión del marcador c-Kit (CD117), presente en los subtipos de espermatogonias generadas en etapas más avanzadas de la ruta de diferenciación, lo que garantiza una población más primitiva y (Dym 1994) por tanto más diferenciada.

Con la obtención de estos resultados, se decidió iniciar los intentos de maduración *in vitro*, para posibilitar la diferenciación de las espermatogonias aisladas mediante el marcador CD49f.

Sin embargo, para que la regulación de la espermatogénesis ocurra, hacía falta una base celular correspondiente al nicho que suplementada con las hormonas necesarias pudiera mantener el microambiente testicular adecuado para suplir la compleja dependencia funcional que existe entre las células germinales y las células de Sertoli (de Franca, Ghosh et al. 1993). Un co-cultivo con células de Sertoli, facilitaría este proceso, ya que estas células se

encuentran pegadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos, dando soporte estructural a las espermatogonias así como a los otros tipos celulares durante la espermatogénesis. A su vez, estas células son estimuladas por la FSH, una de las principales hormonas que junto con la testosterona, posibilita la maduración y diferenciación hasta los espermatozoides, siendo el principal componente del microambiente testicular (Hofmann 2008, Maki, Pacchiarotti et al. 2009).

Una de las metodologías para el aislamiento de las células de Sertoli, es el protocolo mediante el cual, después de la digestión enzimática y la obtención de la mezcla celular a partir de la biopsia testicular, se siembra durante 10 minutos a 37°C, para que solamente las células grandes se peguen a la placa, pues éstas (las células de Sertoli) son las células más grandes presentes en el testículo (Shi, Zhang et al. 2010). Después, para disminuir la presencia de otros tipos celulares (células peritubulares, de Leydig y numerosas células intersticiales) se probó purificar la población de células de Sertoli a través de la tinción con rojo nilo. Esta tinción es específica para componentes lipídicos, las cuales van a estar presentes en las células de Sertoli por efecto combinado de la FSH y la testosterona. La FSH induce en estas células la liberación de cuerpos residuales (gotas citoplasmáticas) y al poseer receptores de andrógenos captan la testosterona presente en el testículo (Hall, Martin et al. 1994), la cual a su vez produce la acumulación de lípidos en el interior de los cuerpos residuales

presentes en las células de Sertoli, siendo posible el aislamiento de éstas células a través del rojo nilo, un colorante lipófilo (Mather, Attie et al. 1990).

Las células aisladas proliferaron *in vitro* con un tiempo de duplicación de aproximadamente 3-4 días, presentaron la característica ultraestructural típica de acumulo de gotas lipídicas, así como la inmunexpresión positiva de GATA-4 y vimentina. Además, se confirmó la expresión de GATA-4, WT-1, SCF y GAF por PCR y se observó la presencia de uniones específicas (tight junctions), confirmando así las características de las células de Sertoli funcionales humanas (Chui, Trivedi et al. 2011).

Sin embargo, no se pudo demostrar la expresión de receptores de FSH por PCR, lo cual puede ser debido a la no estimulación *in vitro* con FSH de las células de Sertoli en ese momento.

Después de obtener la línea de células de Sertoli y la selección del medio de cultivo más apropiado para mantener la indiferenciación celular se necesitaba una matriz que sirviera de base para las células de Sertoli y la adición de las hormonas necesarias para el mantenimiento de la espermatogénesis además de la inclusión de algún factor que llevara a las células a entrar en el proceso de meiosis.

Como matriz extracelular, semejante a la encontrada en la lamina basal de los túbulos seminíferos, se eligió el colágeno ya que este actúa en la formación de las uniones específicas entre las células de

Sertoli fundamental para el progreso meiótico de las células germinales a través de la formación de la barrera hemato-testicular (Siu and Cheng 2008).

Para tener el control hormonal, fueron seleccionadas la FSH y la testosterona, las dos principales hormonas que actúan en los testículos para regular la espermatogénesis. En primer lugar, la FSH es requerida para la iniciación de la espermatogénesis y su lugar de acción primario está en los receptores localizados en la membrana de las células de Sertoli (Steinberger, Steinberger et al. 1964, Walker and Cheng 2005) de modo que la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis, conjuntamente con la maduración testicular dependen de la secreción de FSH (Niederberger, Agulnik et al. 1997). Por otro lado, la testosterona es requerida para las divisiones meióticas y el desarrollo de las espermátidas que conducirán hasta el espermatozoide. Posee acción directa sobre las funciones de las células de Sertoli, ya que son las únicas células dentro de los túbulos seminíferos que poseen receptores para esa hormona, actuando sobre la línea germinal.

Además, uno de los factores esenciales implicados en la regulación de la diferenciación de las espermatogonias es el ácido retinoico (AR) que ejerce un papel fundamental con respecto a la espermatogénesis normal (van Pelt, van Dissel-Emiliani et al. 1995). Diferentes grupos de investigación (Nayernia, Nolte et al. 2006, Anderson, Baltus et al. 2008, Zhou, Li et al. 2008) han reconocido el papel fundamental del

AR en los mecanismos de regulación implicados en el desarrollo de gametos. El sitio principal de síntesis del AR en los testículos está en las células de Sertoli, desde donde es distribuido hasta las células germinales (Livera, Rouiller-Fabre et al. 2002). Además, hay pruebas que sugieren que dicha distribución está estrechamente regulada y que la respuesta puede ser distinta en los diferentes tipos de células germinales y también parece ser responsable de la diferenciación de las espermatogonias indiferenciadas y del inicio de la meiosis en el epitelio del tubulo seminífero (Koubova, Menke et al. 2006, Hogarth and Griswold 2010). También hay estudios que demuestran que el AR promueve la progresión del desarrollo de los espermatocitos en las primeras etapas de la meiosis (Leid, Kastner et al. 1992, Akmal, Dufour et al. 1997), aunque los mecanismos moleculares a estos efectos no se han esclarecido. Por lo tanto hemos optado por utilizar el AR en nuestros experimentos para inducir la espermatogénesis *in vitro*.

De esta forma, tras el mantenimiento del microambiente testicular, de las muestras de pacientes con AO y AS, con 40ng/ml de GDNF durante 4 días a 32°C para el mantenimiento de la indiferenciación de las células germinales, las espermatogonias (2n) presentes en las muestras fueron purificadas con el anticuerpo CD49f y co-cultivadas con las células de Sertoli RFP sobre matriz de colágeno en presencia de medio suplementado con FSH, Testosterona y AR.

El proceso de la espermatogénesis empieza en la pubertad, después que las espermatogonias se dividen por mitosis aumentando así el número celular y entrando en meiosis, produciéndose de ésta forma el espermatocito primario que posteriormente llegará a espermatozoide. El proceso de la meiosis está dividido en 2 etapas de las cuáles la Profase I es la más importante y se divide a su vez en 4 fases (leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno), posibles de identificar a través de las técnicas inmunocitogénéticas. Anticuerpos contra las proteínas meióticas identifican el complejo sinaptonémico (SCP3), el centrómero (CREST) y los sitios de recombinación (MLH1) presentes o ausentes de diferentes modos (Sun, Kozak et al. 2004) como ha sido revisado en el apartado de *Introducción* subapartado *Fases de la Meiosis*. No hay publicaciones hasta la fecha de hoy en las que haya sido posible finalizar el proceso de la meiosis *in vitro* produciendo espermatozoides humanos viables a pesar de que numerosos intentos de maduración han sido probados, mediante el empleo de hormonas, factores de crecimiento, tejido testicular, células germinales y co-cultivo celular (Tesarik, Guido et al. 1998, Cremades, Bernabeu et al. 1999, Tesarik, Bahceci et al. 1999, Tesarik, Mendoza et al. 2000, Tesarik, Mendoza et al. 2000, Sousa, Cremades et al. 2002). Actualmente, ha sido publicada la producción de espermatozoides *in vitro* a través del cultivo de tejido gonadal de ratones neonatos, capaces de fertilizar embriones y producir descendientes (Sato, Katagiri et al. 2011). En éste trabajo se ha ido en busca del medio de cultivo y de las condiciones físicas ideales para

mantener, madurar y diferenciar un tejido *in vitro* (Riboldi, Rubio et al. 2012).

En ésta tesis doctoral, se ha proporcionado el nicho testicular adecuado para las SSCs para que el proceso de la espermatogénesis continúe. Éste nicho se consigue poniendo células que ya estén en la línea de diferenciación apropiada, como son las espermatogonias, sobre un “tejido específico”, que en éste caso sería una monocapa de células de Sertoli, principal componente de la lamina basal de los túbulos seminíferos. Bajo la monocapa de las células de Sertoli, se sitúa una matriz extracelular de colágeno. A todo el conjunto se le añade un medio de cultivo compuesto por hormonas, como la FSH y Testosterona así como factores como el AR, que contribuye a que las células entren en el proceso de la meiosis, y como el GDNF, que mantiene el nicho testicular (Riboldi, Rubio et al. 2012).

Transcurridos los días de co-cultivo *in vitro*, en una de las muestras se observó la presencia de células haploides en el análisis por FISH. Dicha muestra correspondía a un paciente con AS, por lo tanto con alteración basal de su línea germinal (Riboldi, Rubio et al. 2012).

Con el análisis correspondiente a las fases de la meiosis, mediante la técnica de inmunocitoquímica para los tres marcadores: SCP3, CREST y MLH1, ha sido posible observar un aumento en el número de células que entraron en el proceso de meiosis en los primeros días de co-cultivo. En día 3 de co-cultivo, fueron detectados los estadios tempranos de la meiosis (leptoteno y zigoteno) (primeras etapas de

la meiosis) con el marcaje de SCP3 y CREST, mientras que en día 5, se detectaron los estadios de zigoteno y paquiteno, también con el marcaje de SCP3 y CREST, observándose así un leve progreso de la meiosis. Se demuestra así que, a través del co-cultivo con las células de Sertoli y con el medio de maduración, ha sido posible que se pueda detectar el comienzo de la meiosis por parte de las SSCs y en algunos casos raros de pacientes con AS, la existencia de células haploides (Riboldi, Rubio et al. 2012).

Sin embargo, todavía nos falta encontrar las condiciones físicas y biológicas adecuadas para la supervivencia y maduración efectiva de estas células que entraron en el proceso de meiosis pero no la concluyeron. Además, es necesario conocer los cambios genéticos que se producen en las células maduras que entraron en meiosis.

Los resultados obtenidos en este estudio, abren la posibilidad de una nueva estrategia en la clínica que permita a pacientes infértiles lograr obtener sus propios gametos. La maduración *in vitro* de las SSCs presentes en el tejido testicular puede posibilitar una alternativa prometedora en la área de la reproducción asistida para que pacientes con diferentes tipos de azoospermia secretora o varones jóvenes que han padecido algún tipo de cáncer y sufrieron tratamientos quimioterápicos, puedan tener sus propios descendientes biológicos. Además, posibilitarían el estudio de la espermatogénesis *in vitro* permitiendo en cierta forma comprender cada vez más éste proceso tan complejo.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

- Hemos aislado células CD49f+ desde biopsias testiculares de pacientes con azoospermia secretora u obstructiva siguiendo el protocolo descrito por Conrad et al., (2008). El número medio de células obtenido fue de 1.754.230 células por biopsia, independientemente de la etiología de la azoospermia. Sin embargo el porcentaje de células CD49f+/número total de células fue doble en azoospermias obstructivas versus azoospermias secretoras.
- Por otro lado, hemos demostrado que el protocolo de Conrad et al., (2008) no es eficiente para el mantenimiento de las SSCs dando lugar a una población de células mesenquimales. Este mismo resultado ha sido publicado durante la realización de esta tesis por Ko et al., (2010), refutando la publicación inicial de Conrad.
- Basándonos en la modificación de los protocolos de Conrad et al., (2008) y Sadri-Ardekani et al., (2009) mediante el uso del medio M2, hemos podido obtener una población de SSCs caracterizada molecular y fenotípicamente.

- Para la maduración *in vitro* de estas células CD49f+, hemos establecido un método de co-cultivo con células de Sertoli que ha dado lugar a la obtención de células haploides y la presencia de SCP3 y CREST indicando la entrada en meiosis de algunas de estas células así como la finalización por otras.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Akmal, K. M., J. M. Dufour and K. H. Kim (1997). "Retinoic acid receptor alpha gene expression in the rat testis: potential role during the prophase of meiosis and in the transition from round to elongating spermatids." Biol Reprod **56**(2): 549-556.
2. Anderson, E. L., A. E. Baltus, H. L. Roepers-Gajadien, T. J. Hassold, D. G. de Rooij, A. M. van Pelt and D. C. Page (2008). "Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 14976-14980.
3. Braydich-Stolle, L., N. Kostereva, M. Dym and M. C. Hofmann (2007). "Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation." Dev Biol **304**(1): 34-45.
4. Brinster, R. L. (2002). "Germline stem cell transplantation and transgenesis." Science **296**(5576): 2174-2176.
5. Brinster, R. L. and M. R. Avarbock (1994). "Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11303-11307.
6. Brinster, R. L. and J. W. Zimmermann (1994). "Spermatogenesis following male germ-cell transplantation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11298-11302.
7. Buageaw, A., M. Sukhwani, A. Ben-Yehudah, J. Ehmcke, V. Y. Rawe, C. Pholpramool, K. E. Orwig and S. Schlatt (2005). "GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes." Biol Reprod **73**(5): 1011-1016.
8. Burgoyne, P. S. (1988). "Role of mammalian Y chromosome in sex determination." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **322**(1208): 63-72.
9. Byskov, A. G. (1986). "Differentiation of mammalian embryonic gonad." Physiol Rev **66**(1): 71-117.

10. Caires, K., J. Broady and D. McLean (2010). "Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells." J Endocrinol **205**(2): 133-145.
11. Castrillon, D. H., B. J. Quade, T. Y. Wang, C. Quigley and C. P. Crum (2000). "The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9585-9590.
12. Chemes, H. E. (2001). "Infancy is not a quiescent period of testicular development." Int J Androl **24**(1): 2-7.
13. Chui, K., A. Trivedi, C. Y. Cheng, D. B. Cherbavaz, P. F. Dazin, A. L. Huynh, J. B. Mitchell, G. A. Rabinovich, L. J. Noble-Haeusslein and C. M. John (2011). "Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells." Cell Transplant **20**(5): 619-635.
14. Clark, A. T., M. S. Bodnar, M. Fox, R. T. Rodriguez, M. J. Abeyta, M. T. Firpo and R. A. Pera (2004). "Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro." Hum Mol Genet **13**(7): 727-739.
15. Clark, J. M. and E. M. Eddy (1975). "Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse." Dev Biol **47**(1): 136-155.
16. Conrad, S., M. Renninger, J. Hennenlotter, T. Wiesner, L. Just, M. Bonin, W. Aicher, H. J. Buhning, U. Mattheus, A. Mack, H. J. Wagner, S. Minger, M. Matzkies, M. Reppel, J. Hescheler, K. D. Sievert, A. Stenzl and T. Skutella (2008). "Generation of pluripotent stem cells from adult human testis." Nature **456**(7220): 344-349.
17. Cremades, N., R. Bernabeu, A. Barros and M. Sousa (1999). "In-vitro maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells." Hum Reprod **14**(5): 1287-1293.
18. de Franca, L. R., S. Ghosh, S. J. Ye and L. D. Russell (1993). "Surface and surface-to-volume relationships of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat." Biol Reprod **49**(6): 1215-1228.
19. de Kretser D.M., K. L. Loveland, A. Meinhardt, D. Simorangkir, N. Wreford (1998). "Spermatogenesis". Hum Reprod Apr;13 Suppl 1:1-8. Review.

20. de Kretser D. M (2000). Handbook of the Assisted Reproduction Laboratory. CRC Press **2**:17-29.
21. de Rooij, D. G. (1998). "Stem cells in the testis." Int J Exp Pathol **79**(2): 67-80.
22. de Rooij, D. G. (2001). "Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells." Reproduction **121**(3): 347-354.
23. de Rooij, D. G. (2009). "The spermatogonial stem cell niche." Microsc Res Tech **72**(8): 580-585.
24. Donovan, P. J., D. Stott, L. A. Cairns, J. Heasman and C. C. Wylie (1986). "Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture." Cell **44**(6): 831-838.
25. Dunkel, L., V. Hirvonen and K. Erkkila (1997). "Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis." Cell Death Differ **4**(3): 171-179.
26. Dunkel, L., S. Taskinen, O. Hovatta, J. L. Tilly and S. Wikstrom (1997). "Germ cell apoptosis after treatment of cryptorchidism with human chorionic gonadotropin is associated with impaired reproductive function in the adult." J Clin Invest **100**(9): 2341-2346.
27. Dym, M. (1994). "Spermatogonial stem cells of the testis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11287-11289.
28. Dym, M., M. Kokkinaki and Z. He (2009). "Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons." Birth Defects Res C Embryo Today **87**(1): 27-34.
29. Ebata, K. T., X. Zhang and M. C. Nagano (2005). "Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development." Mol Reprod Dev **72**(2): 171-181.
30. Fujimoto, T., Y. Miyayama and M. Fuyuta (1977). "The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells." Anat Rec **188**(3): 315-330.
31. Fujiwara, T., N. R. Dunn and B. L. Hogan (2001). "Bone morphogenetic protein 4 in the extraembryonic mesoderm is required for allantois development and the localization and survival of primordial germ cells in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13739-13744.

32. Gangane, S. D (2008). "Human Genetics". Elsevier 3^a ed. 2:9-32.
33. Ginsburg, M., M. H. Snow and A. McLaren (1990). "Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation." Development **110**(2): 521-528.
34. Godin, I., C. Wylie and J. Heasman (1990). "Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture." Development **108**(2): 357-363.
35. Gohbara, A., K. Katagiri, T. Sato, Y. Kubota, H. Kagechika, Y. Araki, Y. Araki and T. Ogawa (2010). "In vitro murine spermatogenesis in an organ culture system." Biol Reprod **83**(2): 261-267.
36. Golestaneh, N., M. Kokkinaki, D. Pant, J. Jiang, D. DeStefano, C. Fernandez-Bueno, J. D. Rone, B. R. Haddad, G. I. Gallicano and M. Dym (2009). "Pluripotent stem cells derived from adult human testes." Stem Cells Dev **18**(8): 1115-1126.
37. Gomperts, M., M. Garcia-Castro, C. Wylie and J. Heasman (1994). "Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos." Development **120**(1): 135-141.
38. Goto, T., J. Adjaye, C. H. Rodeck and M. Monk (1999). "Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis." Mol Hum Reprod **5**(9): 851-860.
39. Griswold, M. D. (1998). "The central role of Sertoli cells in spermatogenesis." Semin Cell Dev Biol **9**(4): 411-416.
40. Grootegoed, J. A., M. Siep and W. M. Baarends (2000). "Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis." Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **14**(3): 331-343.
41. Guan, K., F. Wolf, A. Becker, W. Engel, K. Nayernia and G. Hasenfuss (2009). "Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes." Nat Protoc **4**(2): 143-154.
42. Hall, J. E., K. A. Martin, H. A. Whitney, H. Landy and W. F. Crowley, Jr. (1994). "Potential for fertility with replacement of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in long term

- female survivors of cranial tumors." J Clin Endocrinol Metab **79**(4): 1166-1172.
43. Hamra, F. K., N. Schultz, K. M. Chapman, D. M. Grellhesl, J. T. Cronkhite, R. E. Hammer and D. L. Garbers (2004). "Defining the spermatogonial stem cell." Dev Biol **269**(2): 393-410.
44. He, Z., J. Jiang, M. Kokkinaki, N. Golestaneh, M. C. Hofmann and M. Dym (2008). "Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation." Stem Cells **26**(1): 266-278.
45. He, Z., M. Kokkinaki, J. Jiang, I. Dobrinski and M. Dym (2010). "Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia." Biol Reprod **82**(2): 363-372.
46. Heller, C. H. and Y. Clermont (1964). "Kinetics of the Germinal Epithelium in Man." Recent Prog Horm Res **20**: 545-575.
47. Hess, R.A. and L.R. de Franca (2009). "Molecular mechanisms in spermatogenesis". Advances in Experimental Medicine and Biology **63**:1-15.
48. Hofmann, M. C. (2008). "Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche." Mol Cell Endocrinol **288**(1-2): 95-103.
49. Hogarth, C. A. and M. D. Griswold (2010). "The key role of vitamin A in spermatogenesis." J Clin Invest **120**(4): 956-962.
50. Holstein, A. F., W. Schulze and M. Davidoff (2003). "Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment." Reprod Biol Endocrinol **1**: 107.
51. Howell, S. and S. Shalet (2001). "Testosterone deficiency and replacement." Horm Res **56 Suppl 1**: 86-92.
52. Izadyar, F., J. Wong, C. Maki, J. Pacchiarotti, T. Ramos, K. Howerton, C. Yuen, S. Greilach, H. H. Zhao, M. Chow, Y. C. Chow, J. Rao, J. Barritt, N. Bar-Chama and A. Copperman (2011). "Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis." Hum Reprod **26**(6): 1296-1306.
53. Kanatsu-Shinohara, M., H. Miki, K. Inoue, N. Ogonuki, S. Toyokuni, A. Ogura and T. Shinohara (2005). "Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions." Biol Reprod **72**(4): 985-991.

54. Kanatsu-Shinohara, M., N. Ogonuki, K. Inoue, H. Miki, A. Ogura, S. Toyokuni and T. Shinohara (2003). "Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells." Biol Reprod **69**(2): 612-616.
55. Kanatsu-Shinohara, M., S. Toyokuni and T. Shinohara (2004). "CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells." Biol Reprod **70**(1): 70-75.
56. Kee, K., R. A. Pera and P. J. Turek (2010). "Testicular germline stem cells." Nat Rev Urol **7**(2): 94-100.
57. Kerr, J. B. (1992). "Functional cytology of the human testis." Baillieres Clin Endocrinol Metab **6**(2): 235-250.
58. Kierszenbaum, A. L. (1994). "Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages." Endocr Rev **15**(1): 116-134.
59. Ko, K., M. J. Arauzo-Bravo, N. Tapia, J. Kim, Q. Lin, C. Bernemann, D. W. Han, L. Gentile, P. Reinhardt, B. Greber, R. K. Schneider, S. Kliesch, M. Zenke and H. R. Scholer (2010). "Human adult germline stem cells in question." Nature **465**(7301): E1; discussion E3.
60. Koopman, P., A. Munsterberg, B. Capel, N. Vivian and R. Lovell-Badge (1990). "Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation." Nature **348**(6300): 450-452.
61. Kossack, N., J. Meneses, S. Shefi, H. N. Nguyen, S. Chavez, C. Nicholas, J. Gromoll, P. J. Turek and R. A. Reijo-Pera (2009). "Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells." Stem Cells **27**(1): 138-149.
62. Koubova, J., D. B. Menke, Q. Zhou, B. Capel, M. D. Griswold and D. C. Page (2006). "Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2474-2479.
63. Kubota, H., M. R. Avarbock and R. L. Brinster (2003). "Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6487-6492.

64. Lange, U. C., M. Saitou, P. S. Western, S. C. Barton and M. A. Surani (2003). "The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice." BMC Dev Biol **3**: 1.
65. Lawson, K. A., N. R. Dunn, B. A. Roelen, L. M. Zeinstra, A. M. Davis, C. V. Wright, J. P. Korving and B. L. Hogan (1999). "Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo." Genes Dev **13**(4): 424-436.
66. Lawson, K. A. and W. J. Hage (1994). "Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse." Ciba Found Symp **182**: 68-84; discussion 84-91.
67. Lee, D. R., M. T. Kaproth and J. E. Parks (2001). "In vitro production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls." Biol Reprod **65**(3): 873-878.
68. Lee, D. R., K. S. Kim, Y. H. Yang, H. S. Oh, S. H. Lee, T. G. Chung, J. H. Cho, H. J. Kim, T. K. Yoon and K. Y. Cha (2006). "Isolation of male germ stem cell-like cells from testicular tissue of non-obstructive azoospermic patients and differentiation into haploid male germ cells in vitro." Hum Reprod **21**(2): 471-476.
69. Leid, M., P. Kastner and P. Chambon (1992). "Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways." Trends Biochem Sci **17**(10): 427-433.
70. Lim, J. J., S. Y. Sung, H. J. Kim, S. H. Song, J. Y. Hong, T. K. Yoon, J. K. Kim, K. S. Kim and D. R. Lee (2010). "Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions." Cell Prolif **43**(4): 405-417.
71. Livera, G., V. Rouiller-Fabre, C. Pairault, C. Levacher and R. Habert (2002). "Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A." Reproduction **124**(2): 173-180.
72. Maki, C. B., J. Pacchiarotti, T. Ramos, M. Pascual, J. Pham, J. Kinjo, S. Anorve and F. Izadyar (2009). "Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testes." Hum Reprod **24**(6): 1480-1491.
73. Marion, R. M., K. Strati, H. Li, A. Tejera, S. Schoeftner, S. Ortega, M. Serrano and M. A. Blasco (2009). "Telomeres

- acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells." Cell Stem Cell **4**(2): 141-154.
74. Mather, J. P., K. M. Attie, T. K. Woodruff, G. C. Rice and D. M. Phillips (1990). "Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis." Endocrinology **127**(6): 3206-3214.
75. Matsui, Y., K. M. Zsebo and B. L. Hogan (1990). "Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit." Nature **347**(6294): 667-669.
76. McLaren, A. (1988). "Somatic and germ-cell sex in mammals." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **322**(1208): 3-9.
77. Meng, X., M. Lindahl, M. E. Hyvonen, M. Parvinen, D. G. de Rooij, M. W. Hess, A. Raatikainen-Ahokas, K. Sainio, H. Rauvala, M. Lakso, J. G. Pichel, H. Westphal, M. Saarma and H. Sariola (2000). "Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF." Science **287**(5457): 1489-1493.
78. Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda and S. Yamanaka (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." Cell **113**(5): 631-642.
79. Mizrak, S. C., J. V. Chikhovskaya, H. Sadri-Ardekani, S. van Daalen, C. M. Korver, S. E. Hovingh, H. L. Roepers-Gajadien, A. Raya, K. Fluiters, T. M. de Reijke, J. J. de la Rosette, A. C. Knegt, J. C. Belmonte, F. van der Veen, D. G. de Rooij, S. Repping and A. M. van Pelt (2010). "Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis." Hum Reprod **25**(1): 158-167.
80. Molyneaux, K. A., J. Stallock, K. Schaible and C. Wylie (2001). "Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration." Dev Biol **240**(2): 488-498.
81. Morimoto, H., M. Kanatsu-Shinohara, S. Takashima, S. Chuma, N. Nakatsuji, M. Takehashi and T. Shinohara (2009). "Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells." PLoS One **4**(11): e7909.

82. Morrison, S. J. and J. Kimble (2006). "Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer." Nature **441**(7097): 1068-1074.
83. Nagano, M., M. R. Avarbock and R. L. Brinster (1999). "Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes." Biol Reprod **60**(6): 1429-1436.
84. Naughton, C. K., S. Jain, A. M. Strickland, A. Gupta and J. Milbrandt (2006). "Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate." Biol Reprod **74**(2): 314-321.
85. Nayernia, K., J. Nolte, H. W. Michelmann, J. H. Lee, K. Rathsack, N. Drusenheimer, A. Dev, G. Wulf, I. E. Ehrmann, D. J. Elliott, V. Okpanyi, U. Zechner, T. Haaf, A. Meinhardt and W. Engel (2006). "In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice." Dev Cell **11**(1): 125-132.
86. Niederberger, C., A. I. Agulnik, Y. Cho, D. Lamb and C. E. Bishop (1997). "In situ hybridization shows that Dazl expression in mouse testis is restricted to premeiotic stages IV-VI of spermatogenesis." Mamm Genome **8**(4): 277-278.
87. Noce, T., S. Okamoto-Ito and N. Tsunekawa (2001). "Vasa homolog genes in mammalian germ cell development." Cell Struct Funct **26**(3): 131-136.
88. Oatley, J. M., M. R. Avarbock and R. L. Brinster (2007). "Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling." J Biol Chem **282**(35): 25842-25851.
89. Oatley, J. M. and R. L. Brinster (2006). "Spermatogonial stem cells." Methods Enzymol **419**: 259-282.
90. Oatley, J. M. and R. L. Brinster (2008). "Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals." Annu Rev Cell Dev Biol **24**: 263-286.
91. Oatley, J. M., M. J. Oatley, M. R. Avarbock, J. W. Tobias and R. L. Brinster (2009). "Colony stimulating factor 1 is an extrinsic

- stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal." Development **136**(7): 1191-1199.
92. Ogawa, T., I. Dobrinski and R. L. Brinster (1999). "Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat." Tissue Cell **31**(5): 461-472.
93. Ohinata, Y., B. Payer, D. O'Carroll, K. Ancelin, Y. Ono, M. Sano, S. C. Barton, T. Obukhanych, M. Nussenzweig, A. Tarakhovsky, M. Saitou and M. A. Surani (2005). "Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice." Nature **436**(7048): 207-213.
94. Palermo, G., H. Joris, P. Devroey and A. C. Van Steirteghem (1992). "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." Lancet **340**(8810): 17-18.
95. Parvinen, M. (1982). "Regulation of the seminiferous epithelium." Endocr Rev **3**(4): 404-417.
96. Payne, S. H., H. A. McKay, H. J. Kreuzer, M. Gierer, H. Bludau, H. Over and G. Ertl (1996). "Multilayer adsorption and desorption: Cs and Li on Ru(0001)." Phys Rev B Condens Matter **54**(7): 5073-5080.
97. Pesce, M., X. Wang, D. J. Wolgemuth and H. Scholer (1998). "Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation." Mech Dev **71**(1-2): 89-98.
98. Pineau, C., A. Dupaix and B. Jegou (1999). "The Co-culture of Sertoli Cells and Germ Cells: Applications in Toxicology." Toxicol In Vitro **13**(4-5): 513-520.
99. Print, C. G. and K. L. Loveland (2000). "Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis." Bioessays **22**(5): 423-430.
100. Remohí, J., A. Pellicer, C. Simón, J. Navarro (2002). "Reproducción Humana". McGraw Hill-Interamericana 2ª ed. Madrid.
101. Riboldi, M., A.I., Marqués Marí, C. Simón (2012a). "Stem Cells and Fertility Preservation in Males". Fertility Preservation 1ªed. Springer. **16**:345-352.

102. Riboldi, M., C. Rubio, A. Pellicer, M. Gil-Salom and C. Simon (2012b). "In vitro production of haploid cells after coculture of CD49f+ with Sertoli cells from testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermic patients." Fertil Steril **98**(3): 580-590 e584.
103. Ross, M., and W. Pawlina (2008). "Histología: texto y atlas color biología celular y molecular". Médica panamericana 5ª ed. **22**:783-795.
104. Ruiz-Vela, A., M. Aggarwal, P. de la Cueva, C. Treda, B. Herreros, D. Martin-Perez, O. Dominguez and M. A. Piris (2008). "Lentiviral (HIV)-based RNA interference screen in human B-cell receptor regulatory networks reveals MCL1-induced oncogenic pathways." Blood **111**(3): 1665-1676.
105. Ryu, B. Y., H. Kubota, M. R. Avarbock and R. L. Brinster (2005). "Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14302-14307.
106. Sadri-Ardekani, H., S. C. Mizrak, S. K. van Daalen, C. M. Korver, H. L. Roepers-Gajadien, M. Koruji, S. Hovingh, T. M. de Reijke, J. J. de la Rosette, F. van der Veen, D. G. de Rooij, S. Repping and A. M. van Pelt (2009). "Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro." JAMA **302**(19): 2127-2134.
107. Saitou, M., S. C. Barton and M. A. Surani (2002). "A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice." Nature **418**(6895): 293-300.
108. Sang, Q. X., M. Dym and S. W. Byers (1992). "Proteases in seminiferous epithelium remodeling." Matrix Suppl **1**: 404-405.
109. Sariola, H. and M. Saarma (2003). "Novel functions and signalling pathways for GDNF." J Cell Sci **116**(Pt 19): 3855-3862.
110. Sato, T., K. Katagiri, A. Gohbara, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, Y. Kubota and T. Ogawa (2011). "In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes." Nature **471**(7339): 504-507.

111. Saunders, P. T., J. M. Turner, M. Ruggiu, M. Taggart, P. S. Burgoyne, D. Elliott and H. J. Cooke (2003). "Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis." Reproduction **126**(5): 589-597.
112. Scholer, H. R., G. R. Dressler, R. Balling, H. Rohdewohld and P. Gruss (1990). "Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex." EMBO J **9**(7): 2185-2195.
113. Seandel, M., I. Falciatori, S. V. Shmelkov, J. Kim, D. James and S. Rafii (2008). "Niche players: spermatogonial progenitors marked by GPR125." Cell Cycle **7**(2): 135-140.
114. Seandel, M., D. James, S. V. Shmelkov, I. Falciatori, J. Kim, S. Chavala, D. S. Scherr, F. Zhang, R. Torres, N. W. Gale, G. D. Yancopoulos, A. Murphy, D. M. Valenzuela, R. M. Hobbs, P. P. Pandolfi and S. Rafii (2007). "Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors." Nature **449**(7160): 346-350.
115. Shi, B., S. Zhang, Y. Wang, Y. Zhuang, J. Chu, S. Zhang, X. Shi, J. Bi and M. Guo (2010). "Expansion of mouse sertoli cells on microcarriers." Cell Prolif **43**(3): 275-286.
116. Shinohara, T., M. R. Avarbock and R. L. Brinster (1999). "beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5504-5509.
117. Simon, L., G. C. Ekman, G. Tyagi, R. A. Hess, K. M. Murphy and P. S. Cooke (2007). "Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance." Exp Cell Res **313**(14): 3090-3099.
118. Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. M. Frischauf, R. Lovell-Badge and P. N. Goodfellow (1990). "A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif." Nature **346**(6281): 240-244.
119. Siu, M. K. and C. Y. Cheng (2008). "Extracellular matrix and its role in spermatogenesis." Adv Exp Med Biol **636**: 74-91.

120. Sousa, M., N. Cremades, C. Alves, J. Silva and A. Barros (2002). "Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells." Hum Reprod **17**(1): 161-172.
121. Spinnler, K., F. M. Kohn, U. Schwarzer and A. Mayerhofer (2010). "Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man." Hum Reprod **25**(9): 2181-2187.
122. Starr, C. and B. McMillan (2010). "Human Biology". Cengage Learning 8^o ed. **18**:364.
123. Steinberger, A. (1975). "In vitro techniques for the study of spermatogenesis." Methods Enzymol **39**: 283-296.
124. Steinberger, E., A. Steinberger and W. H. Perloff (1964). "Initiation of Spermatogenesis in Vitro." Endocrinology **74**: 788-792.
125. Stewart, M. H., S. C. Bendall and M. Bhatia (2008). "Deconstructing human embryonic stem cell cultures: niche regulation of self-renewal and pluripotency." J Mol Med (Berl) **86**(8): 875-886.
126. Sun, F., G. Kozak, S. Scott, K. Trpkov, E. Ko, M. Mikhaail-Philips, T. H. Bestor, P. Moens and R. H. Martin (2004). "Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: case report." Hum Reprod **19**(8): 1770-1773.
127. Sutovsky, P. and G. Manandhar (2006). "The Sperm cell – Production, Maturation, Fertilization, Regeneration". Cambridge University Press.
128. Tadokoro, Y., K. Yomogida, H. Ohta, A. Tohda and Y. Nishimune (2002). "Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway." Mech Dev **113**(1): 29-39.
129. Tanaka, S. S., Y. Toyooka, R. Akasu, Y. Katoh-Fukui, Y. Nakahara, R. Suzuki, M. Yokoyama and T. Noce (2000). "The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells." Genes Dev **14**(7): 841-853.

130. Tesarik, J., M. Bahceci, C. Ozcan, E. Greco and C. Mendoza (1999). "Restoration of fertility by in-vitro spermatogenesis." Lancet **353**(9152): 555-556.
131. Tesarik, J., B. Balaban, A. Isiklar, C. Alatas, B. Urman, S. Aksoy, E. Greco and C. Mendoza (1998). "Effect of FSH on spermiogenesis?" Fertil Steril **70**(5): 983-984.
132. Tesarik, J., M. Guido, C. Mendoza and E. Greco (1998). "Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis." J Clin Endocrinol Metab **83**(12): 4467-4473.
133. Tesarik, J., C. Mendoza, R. Anniballo and E. Greco (2000). "In-vitro differentiation of germ cells from frozen testicular biopsy specimens." Hum Reprod **15**(8): 1713-1716.
134. Tesarik, J., C. Mendoza and E. Greco (2000). "In-vitro maturation of immature human male germ cells." Mol Cell Endocrinol **166**(1): 45-50.
135. Tolkunova E.N., A. B. Malashicheva, E. V. Chikhirzhina, E. I. Kostyleva, W. Zeng , J. Luo, I. Dobrinskiĭ, A. Hierholzer, R. Kemler, A. N. Tomilin (2009). "[E-cadherin as a novel surface marker of spermatogonial stem cells]". Tsitologija **51**(3):212-8.
136. Tournaye, H., E. Goossens, G. Verheyen, V. Frederickx, G. De Block, P. Devroey and A. Van Steirteghem (2004). "Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects." Hum Reprod Update **10**(6): 525-532.
137. van Pelt, A. M., F. M. van Dissel-Emiliani, I. C. Gaemers, M. J. van der Burg, H. J. Tanke and D. G. de Rooij (1995). "Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis." Biol Reprod **53**(3): 570-578.
138. Vincent, S. D., N. R. Dunn, R. Sciammas, M. Shapiro-Shalef, M. M. Davis, K. Calame, E. K. Bikoff and E. J. Robertson (2005). "The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse." Development **132**(6): 1315-1325.

139. Walker, W. H. and J. Cheng (2005). "FSH and testosterone signaling in Sertoli cells." Reproduction **130**(1): 15-28.
140. Wang, H., H. Wang, W. Xiong, Y. Chen, Q. Ma, J. Ma, Y. Ge and D. Han (2006). "Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells in vitro through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining." Reproduction **132**(3): 485-492.
141. Watt, F. M. and B. L. Hogan (2000). "Out of Eden: stem cells and their niches." Science **287**(5457): 1427-1430.
142. Wylie, C. C., D. Stott and P. J. Donovan (1986). "Primordial germ cell migration." Dev Biol (N Y 1985) **2**: 433-448.
143. Wyns, C., M. Curaba, B. Vanabelle, A. Van Langendonck and J. Donnez (2010). "Options for fertility preservation in prepubertal boys." Hum Reprod Update **16**(3): 312-328.
144. Ying, Y., X. M. Liu, A. Marble, K. A. Lawson and G. Q. Zhao (2000). "Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse." Mol Endocrinol **14**(7): 1053-1063.
145. Ying, Y., X. Qi and G. Q. Zhao (2001). "Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7858-7862.
146. Zhao, G. Q., K. Deng, P. A. Labosky, L. Liaw and B. L. Hogan (1996). "The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse." Genes Dev **10**(13): 1657-1669.
147. Zhou, Q., Y. Li, R. Nie, P. Friel, D. Mitchell, R. M. Evanoff, D. Pouchnik, B. Banasik, J. R. McCarrey, C. Small and M. D. Griswold (2008). "Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro." Biol Reprod **78**(3): 537-545.

ANEXO

IX. ANEXO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN TITULADO

“OBTENCION DE CELULAS PLURIPOTENTES A PARTIR DE BIOPSIAS TESTICULARES”.

Con el fin de que pueda decidir si desea participar en este estudio, usted debe comprender las ventajas e inconvenientes del mismo para que sea capaz de tomar una decisión informada al respecto. Este proceso es lo que se conoce como consentimiento informado.

Este consentimiento informado le da información detallada sobre el estudio y además, su médico comentará esta información con usted. Cuando haya comprendido el estudio se le solicitará que firme este consentimiento informado si desea participar en él. Se le dará una copia de este documento para que pueda guardarlo.

La posibilidad de que usted(es) done(n) este material biológico se ampara en la Ley 14/2007, de 3 de julio, sobre investigación biomédica. Su identidad y todos los datos referentes a su información personal serán confidenciales, salvo que se solicite lo contrario por la ley. No se publicará ninguna información que lo identifique en los informes o publicaciones resultantes de este estudio. Se permitirá el acceso para la revisión de sus registros médicos al Comité Ético, y a las Autoridades Sanitarias. Firmando este documento usted está de acuerdo con este documento. Sus datos se encontrarán protegidos por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos Personales.

Tiene el derecho de abandonar el estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación médico-enfermo ni se produzca perjuicio en su tratamiento. Si tiene cualquier pregunta relativa al estudio o a sus derechos como paciente, contacte con el Dr. Carlos Simón Vallés, investigador principal del Banco Nacional de Células

Madre Embrionarias - Nodo de la Comunidad Valenciana, y director científico de la Fundación IVI. E-mail: csimon@cipf.es

La esterilidad es un problema de salud que afecta al 15% de las parejas en edad reproductiva. Entre las muchas causas que la pueden causar, está la disminución de las células germinales femeninas, conocidas como óvulos, así como un gran empeoramiento de su calidad para dar lugar a embriones sanos. Esta disminución acontece de forma fisiológica en la menopausia, pero hay mujeres que la sufren en edad más temprana de manera parcial o total, impidiéndoles procrear a no ser que recurran a la donación de óvulos. Es por ello que actualmente existe una enorme demanda de donación de óvulos que pueda suplir esta carencia para muchas mujeres con problemas de fertilidad. Ante esta situación, la investigación con células madre y la reprogramación celular podrían ayudar a solucionar esta demanda de ovocitos

La medicina regenerativa ha sufrido una importante revolución desde la aparición de las células madre embrionarias humanas (human Embryonic Stem Cells, hESC) y de las novedosas técnicas para su generación a partir de tejidos adultos. Las hESC son células humanas pluripotentes con una enorme capacidad de diferenciarse y formar otros tipos celulares que pueden ser usados como terapia celular para curar muchas enfermedades. Entre estos tipos están células germinales, las cuales son precursoras de los óvulos y los espermatozoides, si bien hasta ahora no se ha conseguido su completa diferenciación y adecuada maduración a partir de células madre humanas. La reprogramación podría permitir la generación de células germinales a partir o bien de hESC o incluso de células diferenciadas del propio organismo.

Nuestro estudio pretende avanzar en el conocimiento necesario para lograr obtener gametos humanos maduros (óvulos y espermatozoides) y células pluripotentes a partir de tejidos adultos, con el fin de ayudar a satisfacer la demanda actual y la necesidad de donaciones por parte de parejas con problemas de fertilidad, así como proporcionar un modelo de desarrollo de los gametos humanos para en el futuro encontrar posibles tratamientos que ayuden a mejorar la cantidad y calidad de las células germinales de pacientes aquejados por problemas de fertilidad.

Mediante este consentimiento, usted acuerda donar una muestra de biopsia testicular para poder ser utilizado en el estudio arriba mencionado y crear las condiciones de cultivo necesarias para la obtención de células madre pluripotentes.

Así mismo, queremos manifestarle claramente que si en algún momento usted(es) decidiera(n) revocar esta decisión, puede(n) hacerlo libremente, siendo las muestras celulares y/o los cultivos o material celular obtenidos a partir de ellas destruidos, sin que su relación con el equipo médico que la atiende se vea afectada en ningún momento.

Nº Historia de la paciente:

TÍTULO DEL ESTUDIO: “Obtención de células pluripotentes a partir de biopsias testiculares”.

INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL PROYECTO:

Prof. Carlos Simón Vallés.

D. _____
(nombre y apellidos), mayor de edad, con DNI _____,
MANIFIESTO que tras haber sido debidamente informada/os sobre el estudio a realizar, ACEPTO de forma libre y consciente la donación de parte de la muestra de biopsia testicular necesaria para llevar a cabo el proyecto de investigación arriba mencionado.

En Valencia, a

Firma y DNI del participante

Firma y DNI del Testigo

REVOCACIÓN:

D.....
y mayor de edad, con domicilio en
.....
....., con DNI y
D....., con
DNI.....

MANIFIESTO que he decidido dejar el estudio y que no se utilice para investigación ninguna muestra biológica que me haya sido extraída.

En Valencia, a

