

CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS GERMINALES DE TESTÍCULO DE RATÓN

Lorena Colmenares*, Elizabeth Merentes y
María Lorena Márquez

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores. Instituto de Biología
Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

*lorenacolmenam@gmail.com

RESUMEN

El desarrollo de sistemas *in vitro* permite dilucidar parte de los mecanismos de la espermatogénesis que son difíciles de abordar en el organismo. En este contexto, nos planteamos caracterizar cultivos primarios de células madre aisladas del tejido del testículo de ratón recién destetado. Los cultivos obtenidos mostraron una población heterogénea formada por diferentes tipos celulares. Por medio de técnicas histoquímicas, se pudo evidenciar la presencia de células madre de la línea germinal; tipo espermatogonias (SSCs) y espermatocitos, así como también células somáticas; células mioideas peritubulares y las células de Sertoli, estas últimas parecen ser cruciales para el mantenimiento de las SSC *in vitro*, debido a la influencia de diversos factores segregados por ella, que estimulan la proliferación celular. Es importante destacar que bajo las condiciones suministradas *in vitro* se pudo observar, además, células similares a espermátidas lo que pudiera sugerir una diferenciación espontánea a partir de espermatogonias sin utilizar factores inductores conocidos.

Palabras clave: células germinales, células Sertoli, testículo, cultivos primarios.

Characterization of the primary culture of mouse testicle germ cells

ABSTRACT

The development of *in vitro* systems makes it possible to elucidate part of the spermatogenesis mechanisms that are difficult to address in the organism. In this context, we set out to characterize primary cultures of stem cells isolated from the testis tissue of newly weanling mice. The cultures obtained showed a heterogeneous population formed by different cell types. AUsing histochemical techniques, it was possible to demonstrate the presence of stem cells of the germinal line, type spermatogonia (SSCs), and spermatocytes, as well as somatic cells; peritubular myoid cells and Sertoli cells, the latter seem to be crucial for the maintenance of SSCs *in vitro*, due to the influence of various factors secreted by them that stimulate cell proliferation. It is important to highlight that under the conditions provided *in vitro*, spermatid-like cells were also evident, which could suggest spontaneous differentiation from spermatogonia without using known inducing factors.

Keywords: germinal line, testis, primary culture, Sertoli cells.

INTRODUCCIÓN

Las células madre se caracterizan por tres propiedades: la autorrenovación, la capacidad de desarrollarse en múltiples líneas celulares y el potencial de proliferar extensamente (Bosch *y col.*, 2007). Estas células constituyen el origen y el reservorio de todos los tipos de tejidos del organismo. Así tenemos las células germinales que mantienen su potencialidad y que pueden dar origen al óvulo en el género femenino o al espermatozoide en el masculino (Lechner, 2007).

Los testículos están compuestos por los túbulos seminíferos formados por un epitelio seminífero el cual se encuentra apoyado sobre una lámina basal y una capa de células mioides peritubulares que rodea todo túbulo; el epitelio seminífero está conformado por las células de Sertoli y los diferentes estadios celulares de la línea germinal masculina, es decir, espermatogonias, espermátidas y espermatozoides.

Un grupo de investigadores en el 2011 lograron por primera vez la producción de espermatozoides funcionales por métodos *in vitro*, a partir de fragmentos de tejido testicular de ratones neonatales en un sistema de cultivo de órganos en geles de agarosa, lo que tiene una gran importancia en el campo del cultivo de células de los testículos, ya que este proceso no se había podido reproducir en mamíferos fuera del organismo (Sato *y col.*, 2011). Principalmente, se requiere utilizar sistemas de cultivo tridimensionales, para que ocurra el proceso de espermatogénesis (Sato *y col.*, 2012; Mahmoud, 2012), a través de este método se ha logrado la inducción de células espermatogénicas de ratones inmaduros incluidas células similares a espermatozoides (AbuMadighem *y col.*, 2018).

Recientemente se logró la recapitulación exitosa de la organogénesis de gónadas fetales y se produjeron espermátidas haploides derivadas *in vitro* mostrando que estas sufren la recombinación meiótica. Además, confirmaron que estas espermátidas fueron capaces de fertilizar ovocitos y soportar el desarrollo temprano del embrión (Yuan *y col.*, 2020). En este contexto se plantea que las técnicas *in vitro* son un modelo alternativo para estudiar la meiosis masculina que son difíciles de abordar en los modelos biológicos *in vivo* como por ejemplo, el ratón, aunado a esto es importante considerar los aspectos éticos cuando se aplican los tratamientos físicos y químicos en animales, que inducen daños en el ADN para estudiar su impacto sobre la meiosis, hoy en día es esencial considerar los principios de las 3R en la investigación animal (López Jiménez *y col.*, 2023).

La manipulación *in vitro* de células germinales ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que subraya la continuación de la línea germinal y desarrollar nuevas técnicas para su modificación o para terapia celular. Así mismo con estos modelos biológicos se puede estudiar el efecto de compuestos que regulan la proliferación y diferenciación de las células tipo espermatogonias (Travers *y col.*, 2013).

Investigaciones con células SSC de línea germinal masculina, demuestran el potencial de estas células para ser la pieza central de una nueva era de aplicación clínica para el tratamiento de la infertilidad y la medicina regenerativa (Kubota y Brinster, 2006; Diao y col., 2022).

En virtud del conocimiento sobre estas células germinales, la importancia que tienen en la producción de un nuevo organismo y los diferentes problemas que se presentan en el momento de la reproducción por el daño o poca funcionalidad de este tipo celular, en este trabajo se ha planteado estudiar el mantenimiento y caracterización de células germinales de testículo de ratón como modelo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones de la cepa NMRI de sexo masculino recién destetados, fueron utilizados debido a que a esta edad los túbulos seminíferos poseen mayor proporción de SSCs en comparación con los de edades más avanzadas, según un trabajo realizado por De Rooij y Mizrack en el año 2008. Los ratones fueron suministrados por el Bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE), de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Central de Venezuela.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para la extracción de los testículos en condiciones de asepsia. Estos se utilizaron para establecer el cultivo primario de las células germinales y/o para el procesamiento histológico y análisis de las características morfológicas del tejido testicular.

Aislamiento y establecimiento del cultivo primario de las células germinales de testículo de ratón. La disección del animal se realizó bajo una campana de flujo laminar horizontal para evitar cualquier tipo de contaminación. Los testículos de ratón obtenidos se colocan en solución buffer fosfato libre de calcio y magnesio (PBS) eliminando el tejido adiposo y el epidídimo para evitar la contaminación del cultivo con otro tipo celular, además se le desprende cuidadosamente la túnica albugínea. Posterior a esto, el material se disgregó mecánicamente hasta obtener cortes de aproximadamente 2 mm, para la realización de la disgregación enzimática.

Los trozos de tejidos de los testículos de ratón se expusieron a la acción de una solución de Tripsina 0,25% con una solución de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,04% en una proporción 1:4 a través de pipeteos continuos, a una temperatura de 37°C; inmediatamente completada la disgregación, se inactivó la acción de la enzima agregando medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB), 100 µm/mL de Estreptomina y 100 U/mL de Penicilina; la suspensión celular obtenida se centrifugó a 724,5 g por 10 minutos (3 veces) y el taco celular se resuspendió en

medio nutritivo para luego ser sembrado en placas de plástico cuya área depende de la cantidad de células viables obtenidas, determinada por medio del colorante azul Tripano y el uso de una cámara de Neubauer.

Los cultivos primarios fueron mantenidos en incubación en atmósfera húmeda de 5% de CO₂ a 37°C, y el medio fue reemplazado cada dos o tres días dependiendo de los requerimientos del cultivo, hasta la confluencia de las células en monocapa.

Caracterización morfológica de las células germinales de testículo de ratón. Las células germinales obtenidas en los cultivos fueron caracterizadas morfológicamente realizando diferentes metodologías, a través de registros fotográficos digitales, con coloraciones histoquímicas de rutina May-Grünwald-Giemsa y la coloración con ácido periódico de Schiff; además se realizó la determinación inmunocitoquímica con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-vimentina, que reconoce la vimentina en los filamentos intermedios del citoplasma de las células de Sertoli. Para la evaluación mediante histoquímica de lectinas se utilizó la lectina *Dolichus biflorus* (DBA) con afinidad a α -N-acetil-D-galactosamina, ya que se ha sugerido que es un marcador específico para caracterizar las células madre de espermatogonias (Izadyar *y col.*, 2003; Aguilar *y col.*, 2004).

RESULTADOS

En este trabajo se analizó las características morfológicas del tejido testicular de ratón recién destetado para luego establecer y caracterizar los cultivos primarios de las células de testículo de ratón. Con relación a las características histológicas del testículo de ratón recién destetado, se puede apreciar que los túbulos están rodeadas por una membrana basal e inmediatamente se encuentra una capa de células mioides peritubulares con morfología fusiforme, el epitelio es estratificado compuesto por células con variedad fenotípica, observando diferentes estadios de las células espermatogénicas, como las espermatogonias con morfología redondeada que presentan un gran núcleo ovoide y un citoplasma escaso, estas células se localizan en la base del epitelio seminífero; a medida que se van diferenciando se van alejando de la base del túbulo seminífero acercándose al lumen de éste, manteniendo las conexiones citoplasmáticas.

También se encuentran los espermatoцитos primarios que se pueden distinguir por poseer mayor proporción de citoplasma que las espermatogonias y presentan un gran núcleo ovoide (Figura 1A). Además, en la Figura 1B se puede observar una estructura formada por una serie de conductos denominada epidídimo, cada conducto está compuesto por un epitelio y en el lumen de este se puede detectar células tipo espermatogonias.

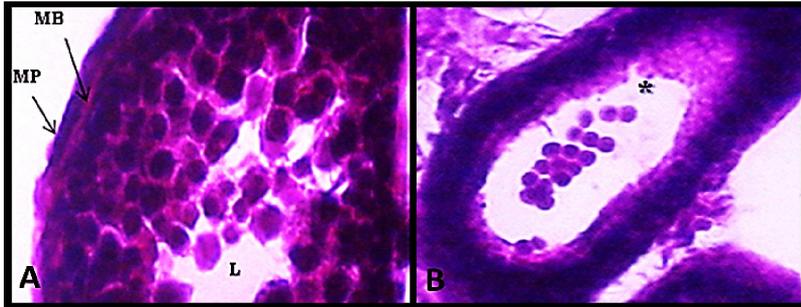


Figura 1. Corte histológico de testículo de ratón recién destetado. (A) Detalle de un túbulo seminífero mostrando diferentes estadios celulares de la espermatogénesis y así como las células mioideas peritubulares (MP) y la membrana basal (MB) 400X. (B) Detalle del epididimo en cuyo lumen (*) se observan células espermatogonias 400X. Coloración Hematoxilina-Eosina.

Establecimiento del cultivo primario de las células germinales de testículo de ratón. El cultivo primario de las células germinales de testículo de ratón se estableció de manera eficaz utilizando la técnica de disgregación enzimática con la enzima Tripsina combinada con el agente quelante EDTA. Las condiciones brindadas a las células cultivadas en monocapa, permitieron la proliferación y mantenimiento del potencial de diferenciación de las células tipo espermatogonias.

En la Figura 2 se muestra los cultivos primarios de células de testículo de ratón donde se contempla una población celular heterogénea, observándose en general células con un citoplasma irregular y extendido, similares a las células somáticas del testículo, estas células se adhieren fácilmente a la superficie de cultivo formando una monocapa confluyente. El otro tipo celular que se observa son células con morfología redondeadas similares a las células de espermatogonias que generalmente crecen por encima de la monocapa formada por las células somáticas.

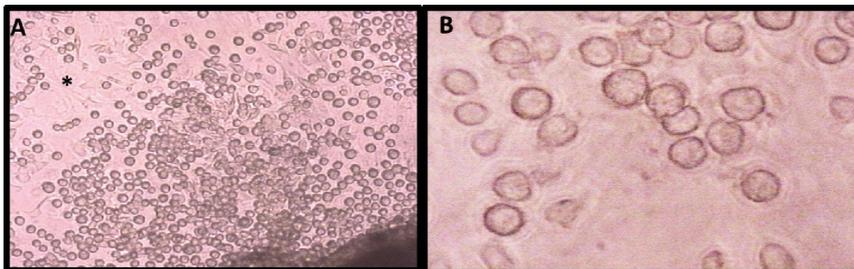


Figura 2. Poblaciones celulares obtenidas por disgregación enzimática con Tripsina-EDTA. Cultivo primario de 20 días. (A) Se observa una heterogeneidad celular. Células con el citoplasma extendido (*) y células redondeadas. Contraste de fases 200X. (B) Detalle de células redondeadas similares a las células de espermatogonias. Contraste de fases 400X.

Las células similares a las espermatogonias en cultivo se pueden encontrar aisladas o formando grupos de diferentes maneras, unas alineadas formando una colonia en hilera y otras se agrupan formando agregados celulares tridimensionales tipo globular (Figura 3A), que de igual forma generalmente crecen sobre la monocapa de células somáticas y se conectan e interactúan a través de puentes citoplasmáticos (Figura 3B).

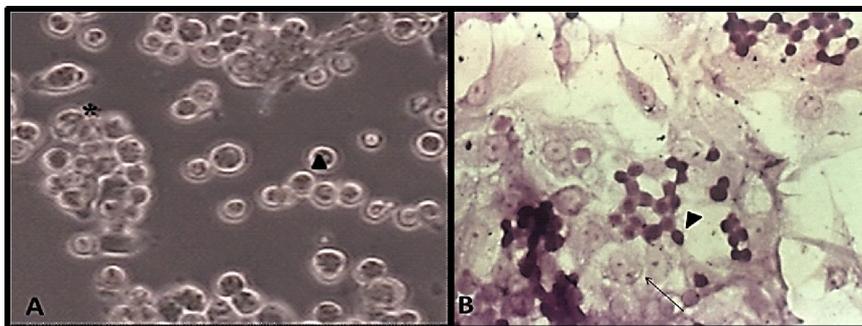


Figura 3. (A) Tipos de colonias formadas por células redondeadas similares a espermatogonias. Se observa un grupo de células alineadas formando una colonia en hilera (punta de flecha) y otros grupos formando agregados celulares tipo globular (*). Contraste de fases 200X. (B) Cultivo primario de 3 días en donde se puede observar células somáticas (flecha) y células similares a espermatogonias (punta de flecha), estas últimas conectadas a través de puentes citoplasmáticos. May-Grünwald-Giemsa 200X.

Las colonias las SSCs se conectan a través de puentes citoplasmáticos constituyendo un sincitio, pudiéndose comunicar entre ellas y sincronizar su desarrollo, estos puentes mencionados pueden indicar una citocinesis incompleta de las SSCs.

En este trabajo caracterizamos a nivel histoquímico los cultivos primarios con la lectina DBA y con el PAS, con lo que se pudo comprobar la presencia de células espermatogénicas en los cultivos (Figura 4). Con la Lectina DBA se observa un marcaje en las células similares a las espermatogonias, mientras que las células somáticas no mostraron marcaje (Fig. 4A), además se puede apreciar claramente las diferentes intensidades del marcaje según la morfología de las células, las más redondeadas mostraron un mayor marcaje y se puede evidenciar la presencia de un núcleo prominente con un nucléolo, estas células presentan escaso citoplasma, mientras que otras células también marcadas pero en menor intensidad presentan forma alargada, con mayor cantidad de citoplasma, presencia de una vacuola y el núcleo desplazado hacia un extremo, estas células son similares a espermátidas alargadas (Figura 4B).

Con la coloración PAS también se pueden distinguir las células espermatoogénicas, las cuales son PAS-positivas mostrando una coloración rosa a diferencia de las células somáticas que no reaccionan al PAS, de igual forma se puede observar la presencia de células alargadas con menor reacción. Las células más redondeadas se ven agrupadas formando colonias en hilera, donde se puede observar los puentes citoplasmáticos que conectan unas células espermatoogénicas con otras de la misma morfología (Figura 4C y 4D).

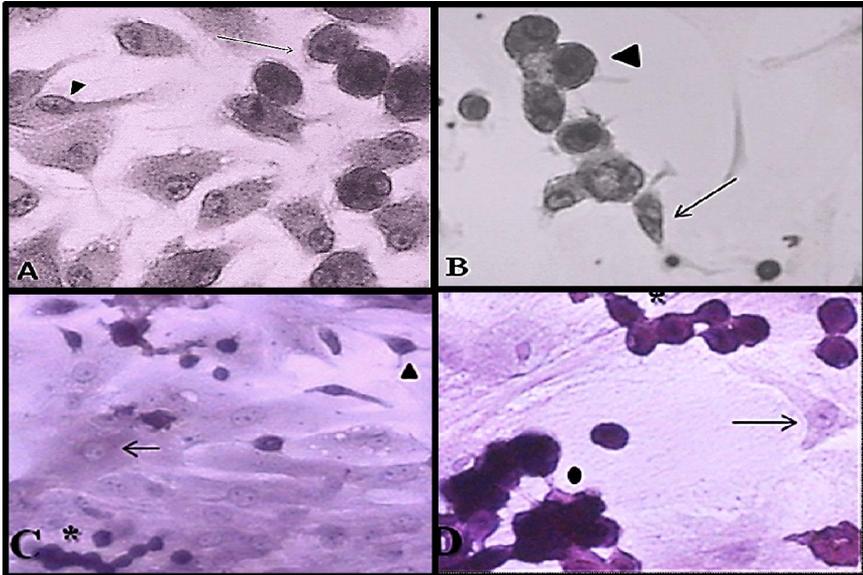


Figura 4. Cultivo primario de células de testículo de ratón de 20 días. (A) Células similares a espermatoogonias marcadas con la Lectina DBA con morfología redondeada con marcaje intenso en el núcleo (flecha) y células con morfología alargada con el núcleo desplazado hacia un extremo (punta de flecha) con menor marcaje 400X. (B) Células similares a espermatoogonias intensamente marcadas (punta de flecha) y células con morfología alargada similares a espermátidas con menor marcaje (flecha). Lectina DBA 400X. (C) Células similares a espermatoogonias PAS+ alineadas formando una colonia en hilera (*), otras células en forma alargada similares a espermátidas con una menor coloración (punta de flecha) y células somáticas PAS-negativas (flecha) 200X. (D) Células similares a espermatoogonias donde se observa la intensidad de la reacción al PAS de estas células agrupadas en hilera (*) y formando agregados celulares unidas a través de puentes citoplasmáticos en ambos casos, también se observan células no reactivas al PAS con un núcleo y citoplasma irregular (flecha). PAS 400X.

Por otro lado, se caracterizó un cultivo primario de 6 días, para determinar la presencia de las células de Sertoli, la caracterización se realizó con el anticuerpo anti-vimentina que reconoce los filamentos intermedios. La Figura 5 muestra el marcaje positivo a la inmunocitoquímica en contra de

vimentina de una célula binucleada con gran extensión del citoplasma similar a las células de Sertoli, interactuando con células con características similares a las espermatogonias.

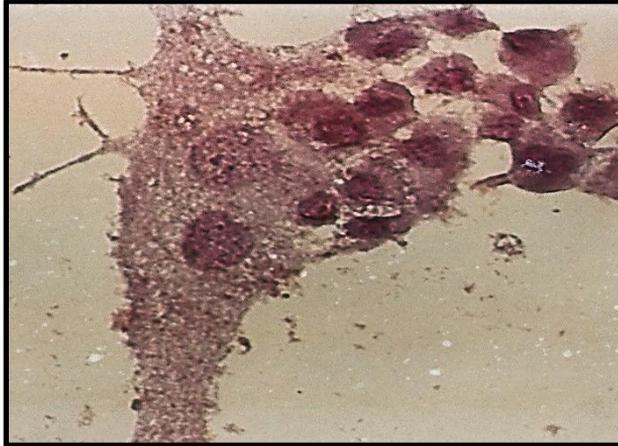


Figura 5. Cultivo de células marcado inmunocitoquímicamente con el anticuerpo anti-vimentina. Se observa sólo el marcaje positivo a la vimentina de una célula binucleada con gran extensión del citoplasma interactuando con las células similares a las espermatogonias 400X.

DISCUSIÓN

Actualmente las células de la línea germinal masculina son de gran interés ya que podrían ser una fuente de células madre adultas. Estas células residen en los testículos de los organismos en donde sufren un proceso de proliferación y diferenciación estimulado y mediado por diversos factores y por el microambiente en donde se encuentran.

Las células germinales masculinas se han logrado aislar y mantener en cultivo bajo diferentes estrategias y microambientes *in vitro*, que han permitido su estudio para ser usadas como fuente de células para la medicina reproductiva y la bioingeniería tisular (Brinster y Avarbock, 1994; Cui *y col.*, 2023). Del mismo modo, se han logrado diferenciar hacia su propio linaje e incluso hacia otros fenotipos celulares en cultivo.

Debido a la importancia que podrían tener estas células madre de espermatogonia como modelo de estudios básicos de la biología del desarrollo testicular y de las grandes posibilidades de aplicación en terapias celulares para el tratamiento de la infertilidad así como de trastornos genéticos (Kubota y Brinster, 2006; Kulibin y Malonina 2023),

en este trabajo presentamos una serie de metodologías que permiten aislar y cultivar las células germinales del testículo de ratón, evaluando el potencial de proliferación y diferenciación de las células madre de espermatogonias.

El cultivo primario de las células germinales de testículo de ratón se estableció de manera eficaz utilizando la técnica de disgregación enzimática con la enzima Tripsina combinada con el agente quelante EDTA. Las condiciones brindadas a las células cultivadas en monocapa, permitieron la proliferación y mantenimiento del potencial de diferenciación de las células tipo espermatogonias.

El cultivo primario presentó una heterogeneidad celular, la cual es dependiente de las características intrínsecas del tejido testicular. Se pudo apreciar la presencia de diferentes fenotipos, entre ellos se observaron células de la línea germinal como espermatogonias y espermatocitos, además de células somáticas como las células de Sertoli y mioides peritubulares, estas últimas tienen características de células musculares, con morfología alargada tipo fusiforme con un núcleo central de manera similar como se presenta *in vivo* (Vivas, 2007), esta morfología pudo ser apreciada en todos los cultivos primarios establecidos, aunque en una baja proporción con respecto a los otros tipos celulares observados.

En relación a las células espermatogonias tipo A conocidas como las células madre de la línea germinal masculina, las SSCs y su morfología han sido descritas como células redondeadas con el núcleo ovoide prominente con cromatina que abarca la mayor parte de la célula (Ross y Pawlina, 2007) además presentan un citoplasma escaso (Izadyar *y col.*, 2003; Tu *y col.*, 2007). En nuestro trabajo se logró obtener células con la morfología descrita por estos autores, sin embargo, en los cultivos no es posible diferenciar los diversos tipos de SSCs bajo el microscopio de contraste de fases, ya que los cambios morfológicos entre las diferentes poblaciones de espermatogonias tipo A no son muy marcados y en la actualidad no se conocen marcadores específicos que permitan diferenciar inequívocamente cada una de ellas (Nagano, 2011).

Los tipos celulares de la línea espermatogénica encontrados en los primeros días del cultivo primario como se ha mencionado fueron las SSCs y los espermatocitos, la ausencia de los otros fenotipos como espermátidas y espermatozoides, se debe a que el material biológico utilizado para el establecimiento del cultivo primario fue ratones neonatos de aproximadamente 20 días de nacido, según investigaciones anteriores hay evidencia de que a los 14 días después del nacimiento del ratón, la población de las células germinales testiculares está constituida sólo por SSCs y espermatocitos (Bellvé *y col.*, 1977; De Rooij *y col.*, 2008), además Nagano *y col.* (2003) reportaron la ausencia de espermátidas en ratones de 18 días de nacidos,

lo que es de relevante importancia en este trabajo para estudiar la caracterización y la diferenciación de las SSCs *in vitro*. Las variantes inherentes a las propiedades biológicas como la edad de los ratones, tienen importantes efectos en el cultivo, pues se ha demostrado que los cultivos de SSCs tienen mayor éxito cuando las células son de testículo de ratón recién nacido (Brinster y Zimmermann, 1994).

En cuanto al comportamiento de los diferentes tipos celulares en el cultivo en monocapa, se observó que al inicio del establecimiento muchas células somáticas se adhieren al sustrato a los primeros días de cultivo formando una monocapa celular, pero un número importante de células germinales que se distinguen por su morfología y tamaño se mantuvieron flotantes en el cultivo, después de ser incubadas 3 días, unas pocas células germinales lograron adherirse al sustrato y la mayoría de ellas sobre la monocapa de células somáticas adherentes, estas observaciones concuerdan con lo reportado por Kanatsu-Shinohara *y col.* (2003). Algunos autores han publicado que las SSCs pueden proliferar en suspensión, pero su proliferación es más activa cuando se encuentran conectadas a una matriz o a una capa de células alimentadoras o “feeder layer” (Tu *y col.*, 2007; Kanatsu- Shinohara *y col.*, 2010; Kossack *y col.*, 2009).

Luego de la adhesión de las SSCs a la monocapa de células somáticas, algunas de ellas se mantuvieron aisladas como células individuales y la mayoría se agruparon formando diferentes tipos de colonias que aumentaron de tamaño al transcurrir los días de cultivo, unas células se alinearon una al lado de la otra formando hileras y otras formaron agregados celulares tipo globular, el mismo comportamiento fue reportado por Koruji *y col.* (2007), quienes aislaron y purificaron los diferentes tipos celulares de testículo de ratón, y observaron la formación de agregados tipo globular de SSCs, al sembrar estas células germinales indiferenciadas sobre una monocapa confluyente de células de Sertoli. En cuanto a las colonias en hilera, esta agrupación celular se ha observado al cultivar las SSCs de testículo de ratón sobre una “feeder layer” en presencia de factores de crecimiento como GDNF, GFR α 1 soluble y FGF2, además se forman agregados celulares tipo globular (Yeh *y col.*, 2007).

Las colonias las SSCs se conectan a través de puentes citoplasmáticos constituyendo un sincitio, pudiéndose comunicar entre ellas y sincronizar su desarrollo, estos puentes mencionados pueden indicar una citocinesis incompleta de las SSCs, y probablemente tienen como función facilitar interacciones bioquímicas que permitan la maduración sincrónica de las células de la línea germinal (Eynard *y col.*, 2008).

Los estudios morfológicos de las células se realizaron a través de coloraciones de rutina Hematoxilina-Eosina y May-Grünwald-Giemsa. Las SSCs se tiñen intensamente con ambas coloraciones mostrando sus características típicas, es decir, el núcleo ovoide prominente se muestra

intensamente basófilo ocupando la mayor parte de las células con el citoplasma teñido levemente, las conexiones citoplasmáticas que conectan a las SSCs se observa claramente con la coloración May-Grünwald-Giemsa, estas características histológicas han sido reportadas por Izadyar *y col.* (2003). En los cultivos de 18 días coloreados con Hematoxilina-Eosina se pudo apreciar la presencia de otra morfología celular similar las de SSCs, pero con modificaciones en el citoplasma; estas células se observaron un poco alargadas, mostrando una transformación estructural de las células en donde pudieran estar ocurriendo cambios a nivel de la organización celular, esto nos permite presumir una diferenciación de las SSCs hacia espermatidas.

Algunos investigadores han señalado el uso de determinaciones histoquímicas como el PAS y la Lectina DBA para caracterizar las células del linaje espermatogénico, ellos sugieren que tanto el reactivo de Schiff (Chang *y col.*, 2001; Aguilar *y col.*, 2004) como la Lectina DBA (Izadyar *y col.*, 2002) son marcadores específicos de las células del linaje espermatogénico.

Posteriormente en el 2007 se pudo determinar que esta lectina DBA puede ser un marcador útil para caracterizar las células madre embrionarias, ya que reconoce epítomos de α -N-Acetil-D-Galactosamina en la superficie de estas células, los cuales van disminuyendo a medida que se diferencian, por esto los autores proponen que la DBA como un marcador de diferenciación que puede predecir la potencialidad del desarrollo (Nash *y col.*, 2007).

Con la coloración PAS también se pueden distinguir las células espermatogénicas, siendo utilizada en otros estudios para comprobar el estado normal de los túbulos seminíferos como en el trabajo realizado por Shawki en el año 2018.

Las diferentes intensidades de reacción y de marcaje descritas anteriormente nos hacen suponer que las células espermatogénicas presentes en los cultivos de células de testículo de ratón se encontraban en diferentes estadios del proceso de espermatogénesis, además con estas determinaciones se pudo evidenciar con mayor exactitud las diferencias morfológicas entre las células de línea germinal masculina.

Las células de Sertoli, *in vivo*, han sido descritas como células cilíndricas con prolongaciones apicales y laterales extensas (Ross y Pawlina, 2007), en cultivo, han sido identificadas con el anticuerpo vimentina (Lu *y col.*, 2020) y se ha señalado que estas células no tienen una morfología definida aunque se observan de gran tamaño con grandes extensiones citoplasmáticas (Izadyar *y col.*, 2003), en nuestro trabajo también se observó esta morfología y se pudo evidenciar, además la presencia de uno o dos núcleos con grandes nucléolos en estas células, siendo negativas a la reacción del PAS de la misma forma que no se marcaron con la histoquímica de Lectina.

Cuando las SSCs y las células de Sertoli estuvieron en contacto se comenzaron a desarrollar las colonias, por lo que al parecer se creó un nicho que favorece su desarrollo, lo que se traduce en que las SSCs necesitan contacto específico con las células de Sertoli en el cultivo. Esta interacción entre las células de Sertoli y las células espermatogénicas es crucial, los factores de crecimiento y citoquinas secretadas por estas células somáticas en la monocapa influyen en la supervivencia de las SSCs indiferenciadas y proporciona un microambiente para la proliferación, formación de colonias y la diferenciación con lo que se explica la importancia que tienen estas células en el éxito del cultivo de las células espermatogénicas. Se ha señalado que uno de los factores secretado por las células de Sertoli es el GDNF, que estimula las SSCs indiferenciadas, probablemente es el factor de crecimiento más importante que interviene en la regulación, proliferación y simultánea autorenovación de las SSCs (Caires *y col.*, 2010; Meng *y col.*, 2000). Recientemente se determinó que el factor de células madre (SCF) producido específicamente por las células de Sertoli es esencial para la espermatogénesis (Peng *y col.*, 2023).

Las células somáticas adheridas al sustrato, compuestas principalmente por células de Sertoli y mioides peritubulares, juegan un papel importante en la proliferación de las SSCs en cultivo, ya que apoya la proliferación y diferenciación de las células germinales. Las células de Sertoli segregan diversos factores que contribuyen al mantenimiento, proliferación y diferenciación de las SSCs, con lo que se explica la importancia que tienen estas células en el éxito del cultivo de SSCs. Se han estudiado los efectos de factores como GDNF, GFR α 1 y bFGF por separado en cultivos de SSCs de ratón sobre una "feeder layer" con un medio libre de suero, determinando que la presencia del factor de crecimiento GDNF contribuye a la formación de agregados celulares tipo globular, mientras que la ausencia de este factor en el cultivo produce una disminución del número de SSCs en el cultivo, este estudio determina la importancia que tiene la presencia de este factor segregado por las células de Sertoli adheridas al sustrato formando una monocapa confluyente en nuestro estudio (Kubota *y col.*, 2004).

Algunas células mioides peritubulares se encontraron en el cultivo; estas células, *in vivo*, se encuentran en la lámina de la membrana basal rodeando los túbulos seminíferos, y contienen elementos contráctiles que generan ondas peristálticas a lo largo de los túbulos para transportar los espermatozoides inmóviles a la red testicular y al epidídimo. Las células peritubulares soportan la proliferación de las células de Sertoli en el cultivo sin la adición de factores, según lo reportado por Schlatt *y col.* (1996). Estos dos tipos celulares en el cultivo, se asemejan al compartimiento tubular *in vivo*, y de esta forma contribuyen a la proliferación de las SSCs *in vitro*, simulando las condiciones microambientales o nicho en el que se encuentran las células germinales de testículos de ratón en el organismo.

En los cultivos de células de testículo de ratón se llevó a cabo el proceso de diferenciación espontánea de las células SSCs hacia espermatidas, evidenciándose una serie de cambios morfológicos que van desde una morfología redondeada características de las espermatogonias tempranas a una morfología alargada, esto se pudo corroborar con las técnicas histoquímicas mencionadas que además de identificar la morfología como células germinales masculinas, de acuerdo al marcaje con la Lectina DBA y la reacción positivamente con el PAS. Además se pudo apreciar en estas células una morfología alargada con un núcleo ovoide desplazado hacia un extremo de la célula y el citoplasma con una extensión en el extremo opuesto al núcleo, similar al fenotipo de las espermatidas en transformación, también se evidenció en nuestros resultados la presencia de vesículas muy cercanas al núcleo de estas células que se asemeja a la vesícula acrosomal, este es un rasgo característico de las espermatidas durante la espermiogénesis (Nagao *y col.*, 1989; Lassalle *y col.*, 1999; Izadyar *y col.*, 2003).

Otro rasgo importante en la diferenciación de estas células en la alineación de las células espermatogénicas, en nuestros resultados se puede evidenciar esta disposición y se observa además que las células en la colonia presentan diferencias morfológicas, las células alineadas van desde SSCs redondeadas con un núcleo prominente y escaso citoplasma, seguido de espermátocitos con mayor proporción de citoplasma y por último en un extremo de la hilera se observan las espermatidas con su morfología alargada, todas interactuando a través de conexiones citoplasmáticas, esto concuerda con lo reportado por Yeh *y col.* (2007), quienes aseguran que estas alineaciones de las células espermatogénicas es el típico comportamiento de la diferenciación de las SSCs en cultivo, pues en las condiciones *in vivo*, las células espermatogénicas tienen una distribución específica en los túbulos seminíferos, en donde las células menos diferenciadas se ubican en la membrana basal y a medida que se van diferenciando se van alejando de esta y se acercan al lumen del túbulo.

La diferenciación espontánea observada en el cultivo, sin añadir factores inductores conocidos pudo deberse a los diversos factores que contiene el SFB, el suero tiene efectos positivos sobre las SSCs en el cultivo y se ha demostrado que la proporción de las células cultivadas en presencia de suero es mayor que en su ausencia (Nagano, 2011). Por otro lado, investigadores sugieren que el destino de las SSCs, *in vitro*, puede estar influenciado por factores brindados en el microambiente, como los factores presentes en el suero (Kanatsu-Shinohara *y col.*, 2010).

El uso de este sistema de cultivo en monocapa, ha brindado la posibilidad de simular de alguna manera las condiciones *in vivo*, permitiendo retener las funciones para mantener la capacidad de autorrenovación, proliferación y su potencial de diferenciación de las SSCs lo cual resulta importante en la inducción de la expresión de un fenotipo.

Se ha señalado que las células madre espermatogénicas y su linaje tienen muchos rasgos comunes entre diferentes especies de mamíferos, primates, ratón y humano. Para poder extrapolar las tecnologías de cultivo y llevarlas a una aplicación clínica en el humano es esencial investigar las similitudes y diferencias entre los diversos modelos estudiados (Fayomi y Orwig, 2018).

LITERATURA CITADA

- AbuMadighem, A., R. Solomon, A. Stepanovsky, J. Kapeloshinik, Q. Shi, E. Meese, E. Lunenfeld, y M. Hueihel. 2018. Development of spermatogenesis in vitro in three-dimensional culture from spermatogonial cells of busulfan-treated immature mice. *Int. J. Mol. Sci* 2018, 19, 3804; Doi: 10.3390/ijms19123804.
- Aguilar, J., M. Gonzalvo, A. Clavero, A. Ortiz, E. González, J. Ortiz, L. Peralta y colaboradores. 2004. Células madre espermatogonias. *Rev. Int. Androl.* 2:54-59.
- Bellvé, A., J. Cavicchia, C. Millette, D. O'Brien, Y. Bhatnagar y M. Dym. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. *J. Cell. Biol.* 74: 68-85.
- Bosch, J., J.M. López-Picazo González, J. García-Foncillas López y F. Prósper Cardoso. 2007. Células madre y cáncer: dilucidando el origen de la célula madre tumoral. *Rev. Med. Univ. Navarra.* 51:14-17.
- Brinster, R. L., y M. R. Avarbock. 1994. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91,11303-11307. doi:10.1073/pnas.91.24.11303.
- Brinster, R. L., y J. W. Zimmermann. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 11298-11302. doi:10.1073/pnas.91.24.11298.
- Caires, K., J. Broady y D. McLean. 2010. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol.* 205:133-145.
- Cui, H., W. Chen, S. Wu, C.L. Wan y Z. He. 2023. Generation of male germ cells in vitro from the stem cells. *Asian J Androl.* 25(1):13-20.
- Chang, Y., J. Lee, S. Panneerdoss, J. MacLean y M. Rao. 2001. Isolation of Sertoli, Leydig, and spermatogenic cells from the mouse testis. *BioTechniques.* 51: 341-344.
- De Rooij, D. y S. Mizrak. 2008. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development.* 135: 2207-2213.
- Diao, L., P.J. Turek, C.M. John, F. Fang y R.A. Reijo Pera. 2022. Roles of spermatogonial stem cells in spermatogenesis and fertility restoration. *Front. Endocrinol.* 13:895528. doi: 10.3389/fendo.2022.895528.
- Eynard, A., M. Vlentich. y R. Rovasio. 2008. Histología y embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares. 4ta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Fayomi, A y Orwig, K. 2018. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res.* 29:207-214.
- Izadyar, F., J. Matthijs-Rijsenbilt, K. Den Ouden, L. Creemers, H. Woelders y D. De Rooij. 2002. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J. Androl.* 23: 537-545.
- Izadyar, F., K. Den Ouden, L. Creemers, G. Posthuma, M. Parvimen y D. De Rooij. 2003. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol. Reprod.* 68: 272-281.

- Kanatsu-Shinohara, M., N. Ogonuki, K. Inoue, H. Miki, A. Ogura, S. Toyokuni y colaboradores. 2003. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 69, 612-616. doi:10.1095/biolreprod.103.017012.
- Kanatsu-Shinohara, M., K. Inoue, N. Ogonuki, H. Morimoto, A. Ogura y T. Shinohara. 2010. Serum-and feeder-free culture of mouse germline stem cells. <http://www.biolreprod.org/>.
- Koruji, M., M. Movahedin, S. Javad. y H. Gourabi. 2007. Colony formation ability of frozen-thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. *Iranian J. Reprod. Medicine.* 5: 109-115.
- Kossack, N., J. Meneses, S. Shefi, H. Nam, S. Chavez, C. Nicholas, J. Gromoll y colaboradores. 2009. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells.* 27: 138-149.
- Kubota, H. y R. Brinster. 2006. Technology insight: in vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat. Rev. End.* 2: 99-107.
- Kulibin A. y E. Malolina. 2023. In vitro spermatogenesis: In search of fully defined conditions. *Front. Cell Dev. Biol.* 11:1106111. doi: 10.3389/fcell.2023.1106111
- Lechner, V. 2007. Stem cells: proyecciones en ingeniería de tejidos. *Rev. Ped. Elec.* 4:17-21.
- Lassalle, B.; A. Ziyat, J. Testart, C. Finaz y A Lefèvre. 1999. Flow cytometric method to isolate round spermatids from mouse testis. *Human Reprod.* 14: 388-394.
- López-Jiménez P, I. Berenguer, J. de Aledo, M. Parra, J. Page y R. Gómez. 2023. The organotypic culture of mouse seminiferous tubules as a reliable methodology for the study of meiosis in vitro. <https://doi.org/10.1101/2023.02.03.526942>.
- Lu, L., Q. Zhang, M. Ren, E. Jin, Q. Hu, C. Zhao, y S. Li. 2020. Effects of boron on cytotoxicity, apoptosis and cell cycle of cultured rat Sertoli cells in vitro. *Biol Trace Elem Res* 196: 223.230.
- Mahmoud, H. 2012. Concise Review: Spermatogenesis in an artificial three-dimensional system. *Stem Cells*, 30:2355-2360.
- Meng, X., M. Lindahl, M. Hyvönen, M. Parvinen, D. de Rooij, M. Hess, A. Raatikainen, y colaboradores. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* 287: 1489-1493.
- Nagao, Y. 1989. Viability of meiotic prophase spermatocytes of rats is facilitated in primary culture of dispersed testicular cells on collagen gel by supplementing epinephrine or norepinephrine: evidence that meiotic prophase spermatocytes complete meiotic divisions in vitro. *Cell Dev. Biol.* 25: 1088-1098.
- Nagano, M., B. Ryu, C. Brinster, M. Avarbock y R. Brinster. 2003. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol. Reprod.* 68: 2207-2214.
- Nagano, M. 2011. Techniques for culturing spermatogonial stem cells continue to improve. *Biol. Reprod.* 84: 5-6.
- Nash, R., L. Neves, R. Faast, M. Pierce y S. Dalton. 2007. The lectin Dolichos biflorus agglutinin recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells.* 25(4):974-82.
- Peng, Y., X. Tang, H. Shu, W. Dong, H. Shao y B. Zhou. 2023. Sertoli cells are the source of stem cell factor for spermatogenesis. *Development* 150, dev200706. doi:10.1242/dev.200706.
- Ross, M. y I. Pawlina. 2007. Histología. 5ta Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.

- Sato, T., K. Katagiri, A. Gohbara, K. Inoue, N. Ogonuk, A. Ogura, Y. Kubata y colaboradores. 2011. In vitro production of functional sperm in culture neonatal mouse tested. *Nature*. 471: 504-508.
- Sato, Y., M. Taniguchi y T. Otoi. 2012. Studying Spermatogenesis by using in vivo and in vitro models: Advantages and disadvantages of these models for practical use. *J Veterinar Sci Technol* 3:115. doi:10.4172/2157-7579.1000115.
- Schlatt, S., D. Kretse y K. Loveland. 1996. Discriminative analysis of rat Sertoli and peritubular cells and their proliferation in vitro: evidence for follicle-stimulating hormone-mediated contact inhibition of Sertoli cell mitosis. *Biol. Reprod.* 55: 227-235.
- Shawki, H., H. Oishi, T. Osui, Y. Kitadate, W. Basha, A. Abdellatif, K. Hasegawa y colaboradores. 2018. MAFB is indispensable for the fetal testis morphogenesis and the maintenance of spermatogenesis in adult mice. *PLoS ONE* 13(1):e0190800.
- Travers, A., B. Arkoun, A. Safsaf, J. Milazzo, A. Absyte, A. Bironneau, A. Perdrix, L. Sibert, B. Macé, B. Cauliez y N. Rives. 2013. Effects of vitamin A on in vitro maturation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells. *PLoS ONE* 8: e82819.
- Tu, J., L. Fan, K. Tao, W. Zhu, J. Li, y G. Lu. 2007. Stem cell factor affects fate determination of human gonocytes in vitro. *Reproduction*. 134: 757-765.
- Vivas, G., J. Lozano y J. Velasco. 2007, Regulación inmuno-testicular y citocinas. *Invest. Clín.* [online]. 48: 107-121.
- Yeh, J., X. Zhang y Nagano, M. 2007. Establishment of a short-term in vitro assay for mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 77:897-904.
- Yuan, Y., L. Li, Q. Cheng, F. Diao, Q. Zeng, X. Yang, y colaboradores. 2020. In vitro testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids. *Cell Res.* 30, 244-255.