



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN *IN*
VITRO DE CÉLULAS GERMINALES DE
TESTÍCULO DE RATÓN**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller Colmenares M, Lorena M., como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. Elizabeth Merentes Díaz

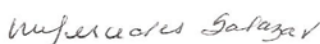
CARACAS, VENEZUELA
Marzo-2012

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO TITULADO
"CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN *in vitro* DE CÉLULAS
GERMINALES DE TESTÍCULO DE RATÓN"

Presentado por la Br. Lorena M. Colmenares M., ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en
Biología.

Defendido públicamente el día 01 de marzo de 2012 y aprobado por los
miembros del jurado designados por el Consejo de Escuela de Biología,
quienes consideraron que dicho trabajo cumplió con los requisitos
exigidos por los reglamentos respectivos.


Dra. Elizabeth Merentes D.
TUTORA


Dra. Mercedes Salazar
JURADO


Dra. Elena Velasco
JURADO

DEDICATORIA

A mi madre que desde mis inicios en la vida me ha enseñado los valores
y la capacidad que poseo como ser humano, además de ser mi pilar,
mostrarme y acompañarme en el camino de la vida... Te amo madre
por ser una persona excepcional, no existen palabras para describir el
inmenso agradecimiento que siento hacia ti.

AGRADECIMIENTO

- Ante todo a Dios, por estar presente en todo lo que hago.
- A mis padres, Argelis y Carlos, sin ellos no habría sido posible culminar esta etapa de mi vida.
- A mi hermana, siempre solidaria, compañera, amiga; gracias por estar en mi vida.
- A mi tutora, Dra. Elizabeth Merentes por abrirme las puertas del laboratorio, confiar en mis capacidades y regalarme sus valiosos conocimientos, además de enseñarme a ser una profesional independiente y brindarme su apoyo incondicional y su inmensa comprensión.
- A mi abuelita y tía Milagros, siempre pendientes de cada paso de mi carrera; y demás familiares por su apoyo absoluto.
- A la profesora Lorena Márquez por las buenas enseñanzas académicas y personales, y las muchas pláticas agradables que hicieron más amenas las horas de trabajo.
- A mis incondicionales amigas, Alexandra e Inés, por su apoyo, compañía y amistad; por sus consejos (no siempre tan buenos) y por hacerme sentir menos loca cuando se unían a mis locuras...
- A mis compañeras de laboratorio Mariangela, Emily y Eliana por sus innumerables ayudas, complicidad y hacer del laboratorio un lugar agradable.

- A los profesores Gilberto Payares, Cristina Sanoja y Valentina Salas por los agradables almuerzos, sus numerosas ayudas y sus sabios consejos.
- A las señoras Mery y Dora por toda la colaboración prestada.
- A mi primo Williams quien más que mi primo es mi hermano por apoyarme y ayudarme en muchos momentos de mi carrera.
- A Nita por sus compañías, amistad, y ayuda a lo largo de mi carrera y a Mema por su incondicional apoyo.
- A Nene por sus regaños oportunos, su cariño, comprensión, por estar siempre presente y lo que ha significado para mí.
- A la profesora Alicia Cáceres, quien además de ser una excelente profesora es una gran amiga.
- Por último a Kalua por acompañarme cada noche en la redacción de este trabajo.

RESUMEN

El propósito principal de cualquier organismo con reproducción sexual es pasar sus genes a la siguiente generación vía sus células germinales, en vista de ello es necesario solventar los problemas que se pueden presentar en el momento de la reproducción por el daño o poca funcionalidad de este tipo celular; estos problemas pueden tener origen tanto en el género femenino como en el masculino, teniendo menor porcentaje de exclusividad en este último según la Organización Mundial para la Salud, por lo que estudios que contribuyen a resolver los problemas generados por el género masculino son escasos. En tal sentido, el objetivo de esta investigación es caracterizar y diferenciar las células germinales de testículo de ratón hacia diferentes estadios de la espermatogénesis, en condiciones *in vitro*.

La espermatogénesis, es el proceso mediante el cual se logra la formación de espermatozoides maduros capaces de fecundar un óvulo; este proceso comienza con las células madre espermatogénicas, que son una población de células madre adultas con capacidad de autorenovarse indefinidamente y de producir células progenies productoras de espermatozoides a lo largo de la vida del individuo. La diferenciación *in vitro* de las células germinales dependerá del uso de factores solubles adicionados a los medios de cultivo, como el factor de células madre (SCF) comúnmente utilizado para la diferenciación de este tipo celular; y a los propios sistemas de cultivo empleados como los cultivos en monocapa y los sistemas tridimensionales, los cuales consisten en proporcionarle a las células las condiciones *in vivo*.

Los cultivos primarios de las células de testículo de ratón recién destetado muestran una población heterogénea formada por: células espermatogonias, espermatoцитos, células de Sertoli y células mioides peritubulares, estas poblaciones lograron mantenerse a lo largo de los subcultivos. Por medio de coloraciones de rutinas e histoquímicas realizadas en diversos cultivos, se pudo evidenciar la presencia de células espermatogénicas PAS positivas y marcadas con la Lectina DBA, como las espermatogonias presentando una morfología redondeada, el núcleo ovoide prominente y escaso citoplasma, y los espermatoцитos con una morfología similar a las espermatogonias pero con mayor proporción del citoplasma. Además, se observó la presencia de células de Sertoli con extensiones citoplasmáticas y de células mioides peritubulares con una morfología alargada tipo fibroblasto. Gracias a la determinación inmunohistoquímica se pudo apreciar la expresión Vimentina en las células de Sertoli. Los cultivos en monocapa sometidos a la inducción así como en los controles, mostraron una diferenciación hacia espermátidas, observándose un serie de cambios morfológicos que van desde morfologías redondeadas característica de las espermatogonias tempranas, a una morfología alargada donde el núcleo esta desplazado hacia un extremo y muy cercano a él se aprecia un a vacuola que se asemeja a la vesícula acrosomal y en el otro extremo el citoplasma extendido; estas células se marcaron con la Lectina DBA y reaccionaron positivamente al PAS. En las matrices tridimensionales sometidas a la inducción se aprecio, en algunas zonas la presencia de estructuras ramificadas, lo que podría indicar la diferenciación hacia otro linaje celular. Además se criopreservaron las células por dos metodología distintas, obteniéndose un alto porcentaje de viabilidad en ambos caso, 86% por el método de vitrificación y 68% por el método convencional utilizando glicerol al 10%

como crioprotector, sin embargo se observó poca adherencia de las células luego del proceso de criopreservación.

Según los diferentes resultados obtenidos se puede sugerir la importancia de la presencia de las células de Sertoli en los diferentes sistemas de cultivos estudiados, para el mantenimiento, proliferación, adhesión y diferenciación de las células germinales hacia su propio linaje *in vitro*.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Células madre, tipos y potencialidad.....	2
1.2. Factores que influyen el comportamiento de las células.....	6
1.3. Efecto del factor de células madre (SCF).....	8
1.4. Sistemas de cultivos.....	9
1.5. Células germinales primordiales y células madre de espermatogonias (SSCs).....	11
1.6. Estructura testicular.....	13
1.7. El proceso de espermatogénesis.....	15
2. ANTECEDENTES.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivo General.....	29
4.2. Objetivos Específicos.....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1. Material biológico.....	30
5.2. Estudio histológico del testículo de ratón recién nacido.....	30
5.3. Aislamiento y establecimiento del cultivo primario de las células germinales de testículo de ratón.....	31
5.3.1. Disgregación enzimática.....	31
5.4. Subcultivos celulares.....	32
5.5. Ensayos de proliferación.....	33

5.5.1. Curva de crecimiento.....	33
5.5.2. Método del MTT.....	33
5.6. Caracterización morfológica de las células germinales de testículo de ratón.....	34
5.6.1. Evaluación morfológica.....	35
5.6.2. Evaluación histoquímica.....	35
5.6.2.1. Coloración MayGrünwald-Giemsa.....	35
5.6.2.2. Coloración con ácido peryódico de Schiff.....	36
5.6.2.3. Coloración Hematoxilina-Eosina.....	36
5.6.2.4. Histoquímica de lectina DBA.....	37
5.6.3. Determinación inmunohistoquímica.....	37
5.8. Inducción a la diferenciación de las células germinales <i>in vitro</i> hacia su propio linaje.....	38
5.9. Evaluación histológica e histoquímica de la inducción a la diferenciación celular de las células germinales.....	39
5.10. Criopreservación de las células germinales obtenidas.....	40
6. RESULTADOS.....	42
6.1. Corte histológico del testículo de ratón recién destetado.....	42
6.2. Establecimiento del cultivo primario y subcultivo de las células germinales de testículo de ratón.....	44
6.3. Características histológicas e inmunohistoquímicas de los cultivos primarios y subcultivos de las células de testículo de ratón.....	47
6.4. Cinética de las células en cultivo.....	52
6.5. Evaluación de la inducción a diferenciación de las células germinales de testículo de ratón bajo diferentes estrategias inductoras.....	54
6.6. Ciopreservación celular y descongelación.....	64
7. DISCUSIÓN.....	66
7.1. Establecimiento de cultivos primarios y subcultivos de las células de testículo de ratón.....	67

7.2. Características histológicas e inmunohistoquímicas de los cultivos primarios y subcultivos de células de testículo de ratón.....	73
7.3. Cinética de las células en cultivo.....	77
7.4. Inducción y caracterización de la diferenciación de las células de testículo de ratón.....	78
7.5. Criopreservación celular.....	84
8. CONCLUSIONES.....	85
9. RECOMENDACIONES.....	87
10. BIBLIOGRAFÍA.....	88
11. APÉNDICES.....	98
11.1. Medios y soluciones utilizadas en cultivo celular.....	98
11.1.1. Solución Buffer de Fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio.....	98
11.1.2. Medio DMEM.....	98
11.1.3. Medio nutritivo.....	99
11.1.4. Solución de Tripsina al 0,25%.....	99
11.1.5. Solución de Gelatina al 1%.....	100
11.1.6. Solución de EDTA al 0,02%.....	100
11.1.7. Soluciones STOCK de los Factores SCF.....	100
11.1.8. Medio Inductor.....	100
11.1.9. Solución de equilibrio para la vitrificación.....	101
11.1.10. Solución de vitrificación.....	101
11.1.11. Medio de congelación.....	101
11.2. Extracción de colágeno tipo I a partir de la cola de rata.....	102
11.3. Soluciones colorantes.....	103
11.3.1. Solución de Ácido Peryódico.....	103

11.3.2. Solución de Schiff de Coleman.....	103
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación de las células madre.....	5
Figura 2. Origen y migración de las células germinales primordiales en el embrión humano.....	12
Figura 3. Estructura testicular humana.....	13
Figura 4. Epitelio seminífero.....	14
Figura 5. Anatomía del testículo y el proceso de espermatogénesis en el ratón.....	16
Figura 6. Corte histológico del testículo.....	17
Figura 7. Corte histológico de testículo de ratón recién destetado.....	44
Figura 8. Población celulares obtenida con disgregación enzimática con Tripsina-EDT.....	45
Figura 9. Tipos de colonias formadas por las células redondeadas similares a espermatogonia.....	46
Figura 10. Subcultivo de células de testículo de ratón.....	47
Figura11. Cultivos primarios de células de testículo de ratón recién destetados.....	48
Figura12. Cultivos primarios de células de testículo de ratón caracterizados histoquímicamente.....	50
Figura 13. Cultivo de células de testículo de ratón de 15 días con PAS.....	51
Figura 14. Cultivo de células de testículo de ratón de 6 días marcado inmunohistoquímicamente con el anticuerpo anti-vimentina.....	52
Figura 15. Curva de crecimiento de las células de testículo de ratón.....	53
Figura 16. Curva de proliferación de células de testículo de ratón.....	54
Figura 17. Cultivos primarios de 20 días de células de testículo de ratón sin factor SCF en el medio.....	56
Figura 18. Cultivos primarios de 20 días de células de testículo de ratón con factor SCF en el medio.....	58
Figura 19. Células de testículo de ratón embebidas en una matriz tridimensional de colágeno tipo I.....	60

Figura 20. Células de testículo de ratón embebidas en una matriz tridimensional de colágeno tipo I en presencia del factor SCF.....	61
Figura 21. Caracterización histoquímica del cultivo en matriz tridimensional de colágeno tipo I de células de testículo de ratón.....	63
Figura 22. Caracterización histoquímica de células de testículo de ratón incluidas en una matriz tridimensional de colágeno tipo I en presencia del factor SCF	63
Figura 23. Estructuras encontradas en la matriz tridimensional de colágeno tipo I con la influencia del factor SCF.....	63
Figura 24. Cultivo celular de células después del proceso de criopreservación.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Porcentaje de viabilidad celular después de la descongelación con glicerol al 10% y por el método de vitrificación.....	62

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
bFGF	Factor Básico de Crecimiento de Fibroblasto
CGP	Células Germinales Primordiales
DAB	Diaminobencidina
DBA	<i>Dolichus biflorus</i>
DMEM	Medio de Cultivo Eagle modificado por Dulbecco's
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
FA	Fosfatasa Alcalina
GDNF	Factor Neurotrófico derivado de la Línea Celular Glial
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GFRα1	Receptor Alfa 1 del Factor Neurotrófico derivado de la Glia
HRP	Enzima Peroxida de Rábano
IBE	Instituto de Biología Experimental
KSR	Proteína Supresora de Ras
LIF	Factor Inhibitorio de la Leucemia
MEC	Matriz Extracelular
MEM	Medio Mínimo Esencial
MSC	Células Madre Mesenquimales
MTT	3-(4,5 Dimetil, tiazol-2 y 1)-2,5 bromuro de Difenil tetrazolium
Nanog	Factor de Transcripción Homeobox
Oct-4	Factor de Transcripción con Homeodominio de la Familia POU
OMS	Organización Mundial para la Salud

PAS	Ácido Peryódico de Schiff
PBS	Solución Buffer Fosfato
PROH	1,2-propanediol
RPMI	Medio del Instituto Memorial Roswell Park
Sox-2	caja 2 de la región Y determinante del sexo
SBF	Suero Fetal Bovino
SCF	Factor de Células Madre
SSC	Células madre espermatogonia
TBS	solución buffer trisfosfato

1. INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos están formados por células y todas las células del organismo tienen exactamente la misma información genética. Sin embargo, no todas se comportan igual y algunas de ellas tienen todavía la capacidad de generar nuevos tejidos y hasta nuevos órganos, como si fueran células de un embrión en gestación, a estas células se las conoce como células madre. 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. En concreto, todo el desarrollo embrionario de un individuo ocurre a partir de una única célula madre denominada cigoto que, mediante los procesos básicos del desarrollo y tales como proliferación, diferenciación y morfogénesis, generarán un individuo completo (Gómez y Campo, 2008).

La investigación sobre células madre es uno de los campos más prometedores de la biotecnología, ofreciendo la posibilidad de desarrollar nuevos métodos para reparar o sustituir tejidos o células dañadas, así como el tratamiento de enfermedades (Organización Médica Colegial de España, 2003). El conocimiento de la existencia de células madre ha hecho posible su investigación para fines terapéuticos. En la actualidad, la terapéutica celular es uno de los temas más excitantes de la medicina contemporánea. Se han realizado diversos estudios con células madre de origen embrionario, induciendo su diferenciación hacia diferentes linajes, sin embargo debido a las dificultades éticas que han surgido cuando se trata de aplicar a seres humanos, los científicos están centrando cada vez más sus

esfuerzos en el estudio de células madre adultas, lo cual está dando resultados de forma rápida (Pastor y col., 2010).

1.1 Células madre, tipos y potencialidad

Las células madre son un tipo especial de célula que posee la capacidad de replicarse indefinidamente y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas. Estas células no están especializadas y permanecen en ese estado hasta que son afectadas por factores epigenéticos que inducen su diferenciación. Lo que hace únicas a las células madre es la capacidad de autorrenovarse, generando células idénticas, de reconstrucción funcional de tejidos y de diferenciación hacia células especializadas (Bianco y col., 2001; Weissman, 2000).

Las células madre se clasifican de acuerdo al tejido de donde se pueden obtener, pueden proceder del embrión o de un organismo adulto, de ahí que se hable de células madre embrionarias y de células madre adultas. Las células madre embrionarias pueden ser obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión, específicamente del blastocito; éstas son entonces precursores pluripotenciales con gran capacidad de proliferación *in vitro*. Una de las ventajas del uso de células madre embrionarias en la investigación es su potencial de diferenciación, ya que son capaces de generar una variedad de tipos celulares, lo que permite que bajo ciertas condiciones puedan ser manipuladas *in vitro* con el fin de producir precursores de un linaje específico y contribuir así al tratamiento de enfermedades; además pueden ser utilizadas como modelo para estudiar enfermedades producidas durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, al tratarse de

células muy indiferenciadas, éstas pueden inducir la formación de ciertas neoplasias como teratomas y las implicaciones éticas generadas por su uso son un punto importante a tener en cuenta (Rodríguez, 2005).

Además existen otras dos fuentes a partir de las cuales es posible aislar células madre embrionarias, las células germinales embrionarias, las cuales se desarrollan en los tejidos gonadales del embrión o feto y que dan lugar posteriormente a los gametos; y las células de carcinoma embrionarias, las cuales provienen de tumores complejos denominados teratocarcinomas, estos tumores son una masa amorfa que se encuentran en el tejido gonadal adulto (Arias y Felmer, 2009).

Las células madre adultas son células indiferenciadas que se encuentran en la mayoría de los tejidos que conforman un organismo, tales como médula ósea, sistema nervioso, sistema gastrointestinal, musculatura esquelética y cardíaca, hígado, páncreas y pulmón, y son capaces de autoregenerarse y diferenciarse a un fenotipo celular especializado del tejido u órgano en donde se encuentran; su función principal es la de mantener y reparar dicho tejido (Anderson y col., 2001). Se cree que este tipo de célula madre reside en un área específica de cada tejido, en donde permanecen quiescente por mucho tiempo hasta ser activadas por una señal (Merentes, 2009).

En un principio se pensó que las células madre adultas estaban predeterminadas a diferenciarse a un tipo celular procedente de su mismo tejido de origen o al menos de su misma capa embrionaria; sin embargo, esta idea ha sido reevaluada por varios grupos de investigadores cuyos estudios sugieren que las células madre adultas son capaces de

diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen (Rodríguez, 2005).

Por otra parte, las células madre pueden ser clasificadas de acuerdo a su potencialidad, es decir, por la capacidad intrínseca que tienen de generar todos, uno o diversos tipos celulares, con base a las potencialidades se pueden distinguir cuatro tipos de células madre: totipotentes, capaces de diferenciarse hasta generar un organismo completo y membranas extraembrionarias y son producto inmediato de la fecundación; pluripotentes desarrolladas aproximadamente en el cuarto día de la fertilización y puede diferenciarse a cualquier tipo celular de un organismo adulto; multipotentes, capaces sólo de generar células de su mismo linaje embrionario (Fig. 1); y unipotentes, que solamente pueden diferenciarse a un tipo celular como es el caso de los eritroblastos que pueden dar origen a un solo tipo celular terminal (Flores y Paniagua, 2006). De este modo, las células madre totipotenciales solo se pueden obtener durante los primeros tres días después de la fertilización, luego de esto, estas células pasan a ser pluripotenciales, las cuales se pueden encontrar en tejidos adultos junto con células madre multipotenciales y unipotenciales (Flores y Paniagua, 2006).

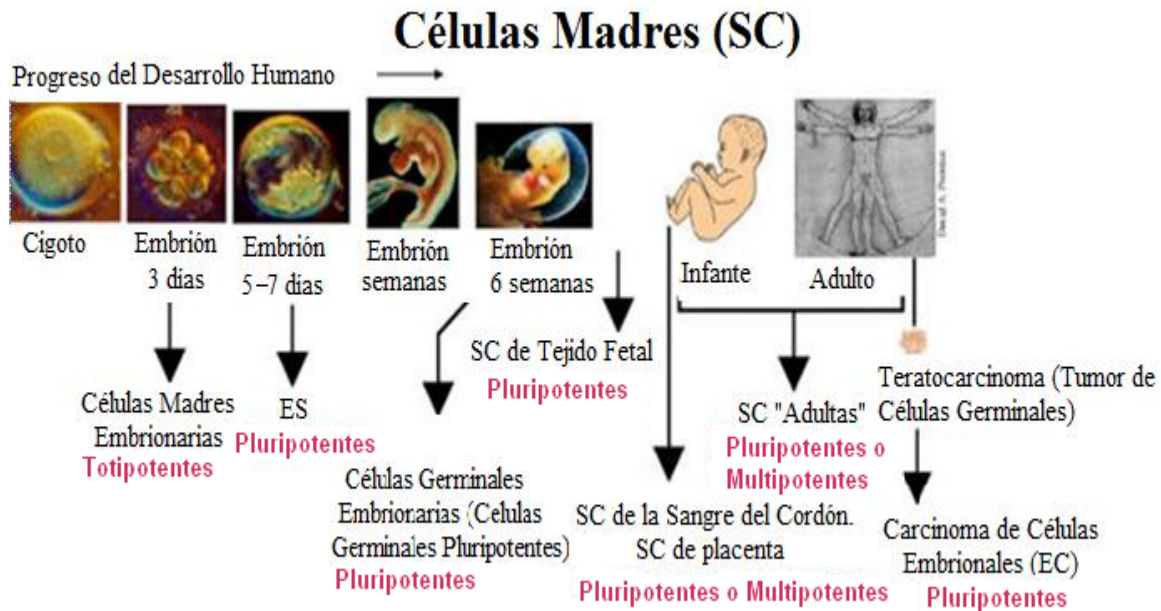


Figura 1. Clasificación de las células madre. Tomado y modificado de Zamudio, 2005.

Observando como el progreso del desarrollo de un organismo compromete la potencialidad de las células, se puede decir que la diferenciación celular produce una disminución de esta; actualmente, la disminución de potencialidad puede ser determinado por medio de marcadores de diferenciación específicos dependiendo del linaje que desarrollen o por medio de la expresión de las proteínas específicas de células madre embrionarias como el factor de transcripción con homeodominio de la familia POU (Oct-4), el factor de transcripción homeobox (Nanog), la caja 2 de la región Y determinante del sexo (Sox-2), la actividad de la fosfatasa alcalina (FA), el receptor del factor inhibidor de la leucemia y el gen 1 específico de las células madre embrionarias (Carlin y col., 2006).

Las células madre unipotentes son células órgano-específicas, que en un principio se creía que estaban limitadas a generar sólo células especializadas y diferenciadas del tejido

donde residen, es decir, habían perdido la capacidad de dar lugar a otras estirpes celulares del organismo, sin embargo, múltiples estudios han demostrado que estas células órgano-específicas pueden diferenciarse a células y tejidos de otras localizaciones y estirpes distintas, como es el caso de las células germinales, que aunque son células altamente especializadas para la generación de gametos, la evidencia de varias líneas sugieren su multipotencialidad (Kanatsu-Shinohara y col., 2004; Zamudio, 2005). Esta capacidad biológica, propia de las células adultas, se fundamenta en su propiedad de reprogramar la expresión de los genes ligadas al proceso de diferenciación en respuesta a los cambios del microambiente circundante donde se desarrollan, es decir, su plasticidad (Rodríguez, 2005).

1.2 Factores que influyen sobre el comportamiento de las células

En la diferenciación de las células madre interviene directamente el microambiente en donde se encuentre, además se le atribuye a diversos factores solubles sobre las células, los cuales pueden ser suministrados al cultivo (en el caso *in vitro*) o encontrarse en el microambiente donde son trasplantadas (en el caso *in vivo*) y son capaces de ejercer efecto en la activación de genes silenciadores (Araos, 2008).

Estos factores de crecimiento son secretados o producidos de forma natural por las células en el microambiente, las células responden a señales producidas por otras células o por ellas mismas, mediante un mecanismo de transmisión de señales celulares, que permite la comunicación intercelular y es necesario para la regulación e integración funcional de los organismos multicelulares. Estos mecanismos de transmisión de señales celulares pueden llevarse a cabo por diferentes vías, por vía endocrina, en donde participa una molécula

transmisora que es secretada por una célula endocrina y es transportada por la circulación para actuar sobre una célula diana alejada; por vía paracrina que viene mediada por una molécula transmisora de señales que actúa localmente para regular el comportamiento de una célula vecina; y por vía autocrina en donde una célula responde a una molécula transmisora de señales que ella misma ha producido (Lodish y col., 2005; Kierszenbaum, 2008). Las tres vías se llevan a cabo en un mismo organismo *in vivo*, pero en cultivo, es decir *in vitro* la transmisión de señales celulares sólo se lleva a cabo por vía paracrina y autocrina. Estos factores son responsables, en parte, de la proliferación y de la inducción a la diferenciación y transdiferenciación de las células, *in vitro*, se pueden añadir al cultivo o al medio, creando, de esta forma medios inductivos, utilizados actualmente en la inducción de un fenotipo determinado en células poco diferenciadas y células madre.

Los factores solubles pueden ser fisiológicos como esteroides, hormonas peptídicas, citoquinas, vitaminas y minerales; o no fisiológicos como compuestos plano-polares, drogas citotóxicas y modificadores de la señal de transducción. Ambos tipos de factores, junto con la interacción célula-célula (homologa u heterologa), la interacción célula-matriz extracelular, la polaridad y forma de la célula y la tensión de oxígeno, se han señalado como responsables de la regulación del proceso de diferenciación celular (Freshney, 2000).

Dentro de los inductores solubles se encuentran los factores de naturaleza biológica, que son proteínas originadas por la activación de protooncogenes conocidas como factores de crecimiento, los cuales contribuyen y regulan el crecimiento, la diferenciación y muerte celular, además de contribuir a la transformación neoplásica celular, ya sea directa o por la acción de sus receptores. Estos polipéptidos están implicados en la regulación de numerosos sistemas del organismo y generalmente son multifuncionales, es decir actúan

sobre diferentes órganos y sistemas, en ocasiones con un efecto estimulante y en otras con carácter inhibitor (Deuel, 1987).

Los inductores no fisiológicos o químicos corresponden a una gran variedad de compuestos químicos cuya acción sobre la célula puede mediar cambios en la fluidez de la membrana, inhibir la transducción de ciertas señales celulares, alterar la metilación del ADN o la acetilación de las histonas, induciendo la expresión de ciertos genes (Freshney, 2000). Estos factores epigenéticos son capaces de generar un microambiente en el cultivo celular, que le permite a las células pasar por etapas específicas de crecimiento y diferenciación y de esta manera modelar un proceso *in vivo* (Vunjak-Novakovic y Freshney, 2006).

1.3 Efecto del factor de células madre (SCF)

Un factor común para la diferenciación de las células madre es conocido como el factor de células madre (SCF por sus siglas en inglés stem cell factor), el cual consiste en una proteína (citoquina) ligando producida por los tejidos fetales y las células del estroma testicular y que se une al receptor del factor de células madre (receptor c-kit), que es una tirosina cinasa. Generalizando, en las células espermatogonias, esta citoquina desempeña un papel importante en la migración, adhesión, proliferación y sobrevivencia durante el desarrollo testicular, además en el adulto este factor protege de la apoptosis a espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas. La proteína ligando se puede encontrar en dos formas, asociada a la membrana y soluble, esta última generada por la ruptura proteolítica de la proteína asociada a la membrana (Kierszenbaum, 2008). El factor de

células madre es sintetizado por las células del estroma de la médula ósea como proteína transmembrana o como proteína secretada; su gen se localiza en la región cromosómica 12q22-q24. Se cree que este factor es necesario para estimular a las células madres a otros factores y con algunos de ellos tiene efecto sinérgico (Rugeles y col, 2009).

1.4 Sistemas de cultivos

En condiciones *in vivo* las células se mantienen en un microambiente, en el cual están constantemente bañadas con fluidos circundantes del cuerpo que proveen todos los compuestos necesarios para la sobrevivencia, diferenciación y proliferación, además de proveer nutrientes y remover productos de desechos (Herrero, 2004), en vista de esto para estudiar las células o tejidos *in vitro*, es necesario su mantenimiento en un sistema de cultivo apropiado que le suministre los compuestos requeridos para cumplir todas sus funciones, procurando mantener al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, siempre tomando en cuenta lo que se desee realizar. La elección de un sistema de cultivo depende de las características de las células, su biología y la capacidad para adherirse o no a sustratos, de esta forma si las células no pueden adherir a un sustrato son anclaje-independientes y se requieren cultivos en suspensión para mantenerlas *in vitro*, debido a que estas células no expresan moléculas de adhesión, por el contrario si las células son anclaje-dependientes, es decir, pueden adherirse a sustrato, se utiliza por lo general cultivos en monocapa, los cuales consisten en sembrar las células sobre superficies de plásticos preferiblemente previamente tratadas para facilitar el proceso de adhesión de las células; una variante de este tipo de cultivo es conocido como cultivo sobre “feeder layer”,

en el cual se hacen crecer las células deseadas sobre otra capa de células, específicamente fibroblastos (previamente inactivada su división celular por irradiación con rayos X o por uso de Mitomicina C), en este tipo de cultivos los factores requeridos por las células deseadas son producidos por la capa de células en la que se hacen crecer (Freshney, 2000).

Otro tipo es el cultivo en sistemas tridimensionales, utilizado para inducciones ya que simulan las condiciones en que se encuentran las células *in vivo*, incluye un conjunto de sustratos como matrices de colágeno tipo I, artificiales y agregados celulares o en micromasas (Freshney, 2000). Las matrices regulan el proceso de diferenciación a través de su composición, ya que pueden generar señales internas por la expresión de moléculas de adhesión específicas a esas moléculas; e interacción célula-factores de crecimiento atrapados por la matriz y moléculas de MEC (Adams y Watt, 1993).

En la diferenciación celular *in vivo* participan diversos factores reguladores, como la información genética de la célula, el número de veces que debe dividirse la célula hasta su diferenciación completa y las proteínas promotoras e inhibitorias del ciclo celular, estas señales son intracelulares; por otra parte también intervienen señales extracelulares como lo son las comunicaciones intercelulares a través de la secreción de moléculas solubles, como factores de crecimiento, hormonas y citocinas y la adhesión selectiva célula-célula (Kierszenbaum, 2008). Para que se pueda llevar a cabo esta diferenciación *in vitro* es necesario proporcionar a las células en cultivo todos los factores inductores que requieren para que se dé el proceso.

El poder establecer distintos tipos de sistemas de cultivos celulares posee ventajas tales como: permitir un control preciso del medio y del ambiente, caracterizar y homogeneizar la

muestra, economizar en el uso de reactivos y drogas, además de motivaciones éticas; pero también se deben tomar en cuenta las desventajas como: la elevada sensibilidad de la técnica aplicada, lo que permite la fácil contaminación de la muestra en el cultivo, la cantidad y costo en el caso de producción de grandes cantidades de tejido, inestabilidad celular, contaminación y la validez del modelo *in vitro* (Cultek, 2007)

1.5 Células germinales primordiales y células madre de espermatogonias (SSCs)

El tipo celular de interés en este trabajo, para el mantenimiento *in vitro*, son las células germinales que son células especializadas del adulto que mantienen su potencialidad y que pueden dar origen al óvulo en el género femenino o espermatozoide en el género masculino (Lechner, 2007). Cada célula germinal es diferente genéticamente por la recombinación genética durante la meiosis. Los gametos que contienen la mitad de la información genética de un individuo, son haploides. Estos gametos son los espermatozoides, que se forman en el testículo y el óvulo, que se forma en el ovario. Las células germinales son fácilmente identificables por su tamaño mucho mayor que el de las células vecinas, presentan actividad fosfatasa alcalina y son reactivas al ácido peryódico de Schiff (PAS), ya que tienen gran cantidad de glucógeno (Botella, 1998).

Tempranamente en la embriogénesis, las células germinales primordiales (CGP) se localizan en las crestas gonadales las cuales colonizan las gónadas primitivas (Figura 2), diferenciándose en células germinales masculinas y femeninas (Lechner, 2007), en este proceso los gametos de ambos sexos se diferencian y maduran hasta ser capaces de llevar a cabo la fecundación. La evolución que sufren las células germinales para prepararse para la

fecundación recibe el nombre de ovogénesis o espermatogénesis, según se trate del gameto femenino o del masculino respectivamente (Matorra y col., 2008). En el proceso las CGP aparecen del saco vitelino y migran hacia el epitelio del intestino primitivo, luego migran a través del mesenterio dorsal hasta alcanzar los primordios gonadales (Carlson, 2009).

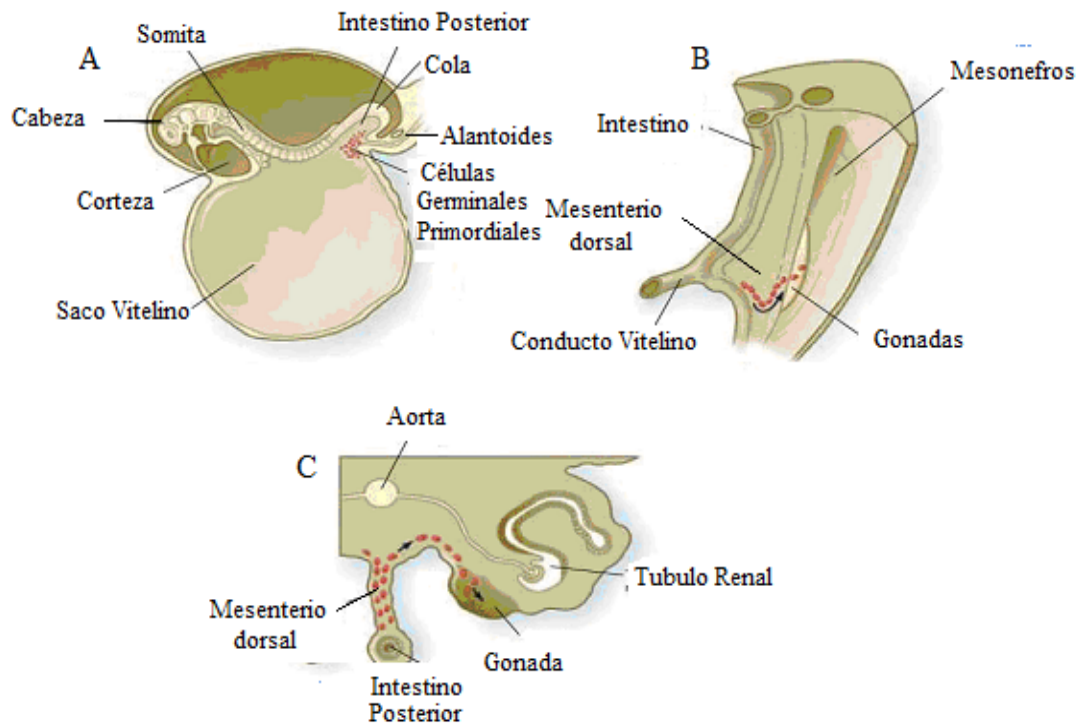


Figura 2. Origen y migración de las células germinales primordiales en el embrión humano. A) localización de estas células en el embrión (vista sagital media); B) vía de migración (flecha) a través del mesenterio dorsal y C) Sección transversal que muestra la vía de migración (flechas) a través del mesenterio dorsal y hacia la gónada. Tomado de Carlson, 2009.

Una vez que las CGP alcanzan las gónadas en el género masculino se lleva a cabo la espermatogénesis, que es un proceso complejo que involucra la autorrenovación y diferenciación de SSCs en espermatidas, estas células madre de espermatogonias maduran en los túbulos seminíferos de los testículos de los mamíferos (He y col., 2010).

1.5 Estructura testicular

Los testículos de los mamíferos son órganos ovoides pares que se encuentran dentro del escroto fuera de la cavidad abdominal. Están suspendidos de los cordones espermáticos y adheridos al escroto por los ligamentos escrotales. Los testículos están rodeados de una cápsula de tejido conjuntivo llamada túnica albugínea, y cada testículo está dividido en numerosos lobulillos por tabiques incompletos de tejido conjuntivo que se proyectan desde la túnica, a su vez cada lobulillo está compuesto por varios túbulos seminíferos muy contorneados (Fig. 3).

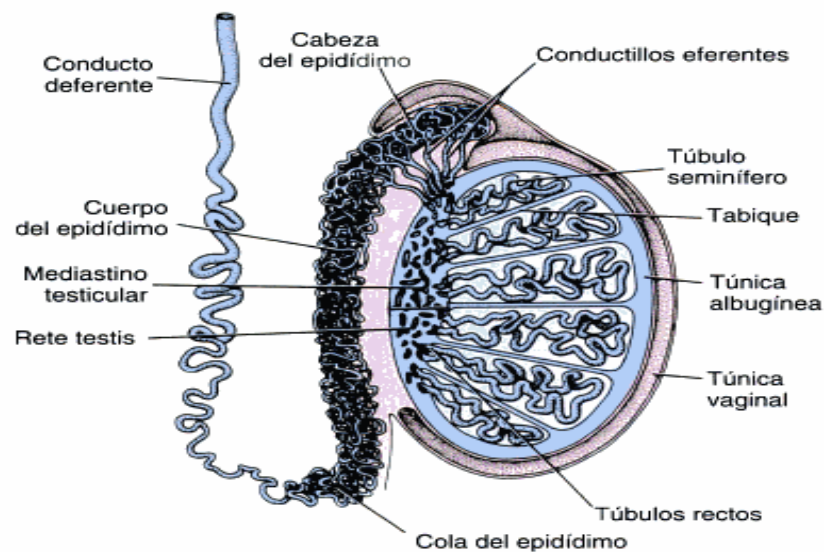


Figura 3. Estructura testicular humana. Se muestra esquemáticamente un corte sagital del testículo humano. También aparece la vía espermática formada por los conductillos eferentes, el conducto epidídimo y el conducto deferente. Además se observa la túnica albugínea que rodea al testículo. Tomado de Ross y Pawlina, 2007.

Los túbulos seminíferos están compuestos por un epitelio seminífero y 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, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides.

Las células de Sertoli se encuentran interactuando a través de un complejo de unión que divide el epitelio en un compartimiento basal y uno adluminal (Fig. 4). Las espermatogonias y los espermatocitos iniciales están restringidos en el compartimiento basal, es decir, entre las uniones células de Sertoli-células de Sertoli y la lámina basal, mientras que los espermatocitos más maduros y las espermatidas están restringidas en lado adluminal (Ross y Pawlina, 2007).

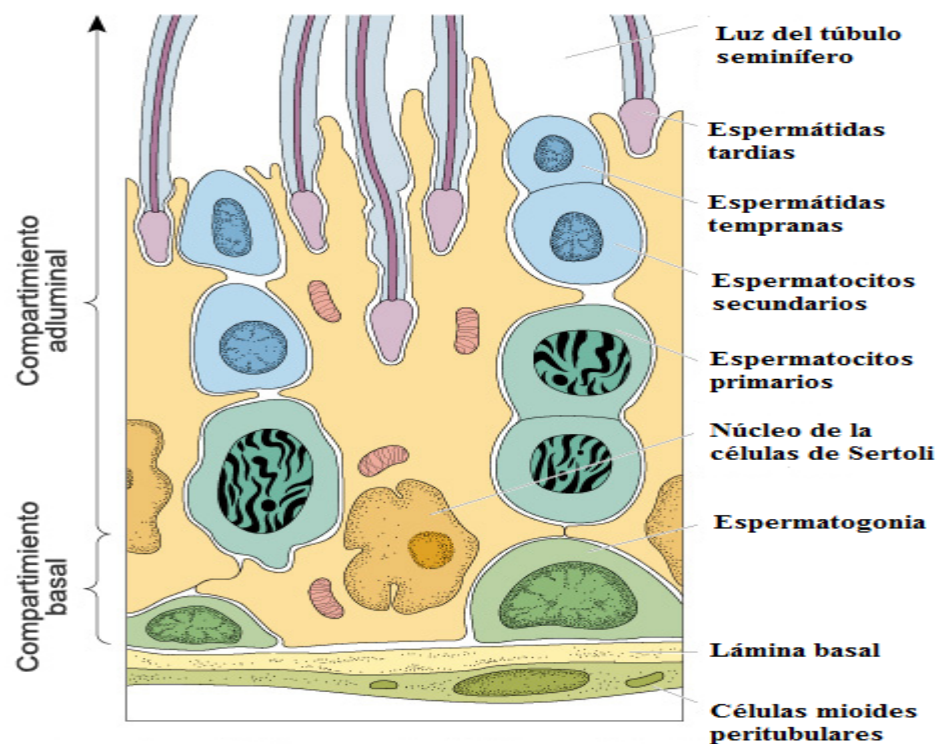


Figura 4. Epitelio seminífero. Se muestra esquemáticamente el epitelio seminífero en donde se puede observar los diferentes tipos celulares que constituyen el compartimiento basal y el adluminal. Tomado de y modificado http://medicosenformacion7.tripod.com/21_005.jpg

Además de estos compartimientos físicos, el complejo de unión entre las células de Sertoli forma una barrera permeable llamada hematotesticular y está constituida por un compartimiento tubular y uno vascular; el compartimiento tubular consta de la lámina basal de los túbulos seminíferos, una capa de células mioideas y principalmente por las células de Sertoli las cuales rodean completamente con sus prolongaciones citoplasmáticas a las células germinales y están adheridas entre sí por uniones herméticas entre sus membranas. Esta disposición de los elementos de la barrera del compartimiento tubular, impide el contacto directo entre las células inmunocompetentes o sus productos y las células germinales. Por otro lado el compartimiento vascular está formado por las células endoteliales de los capilares, las cuales tienen una permeabilidad menor a la de otros capilares corporales, contribuyendo a reforzar la barrera, al dificultar el paso de células o sustancias de alto peso molecular (Vivas y col., 2007).

1.6 El proceso de espermatogénesis

El proceso de espermatogénesis comienza en este órgano con la proliferación mitótica de las SSCs (Carlson, 2009). La espermatogénesis comienza con la división de las CGP para formar SSC tipo A1, estas células son células madre y en la madurez se dividen para producir otra SSC tipo A1, así como un segundo tipo de célula más pálida, conocida como SSC tipo A2; por su parte estas células sufren una segunda división dando lugar a SSC tipo A3, que luego engendra la SSC tipo A4 (figura 5). Existe la probabilidad de que cada uno de los tipos de SSCs A sean células madre capaces de autorrenovarse (Gilbert, 2006).

Las SSC tipo A4 tiene tres opciones: autorrenovarse, sufrir apoptosis o diferenciarse a SSC intermedias, las cuales son el primer tipo de célula madre comprometida a convertirse en espermatozoide. Estas células se dividen y forman las SSCs tipo B, precursoras de los espermatocitos y últimas células de la línea que experimentan mitosis, que al sufrir la división dan lugar a espermatocitos primarios.

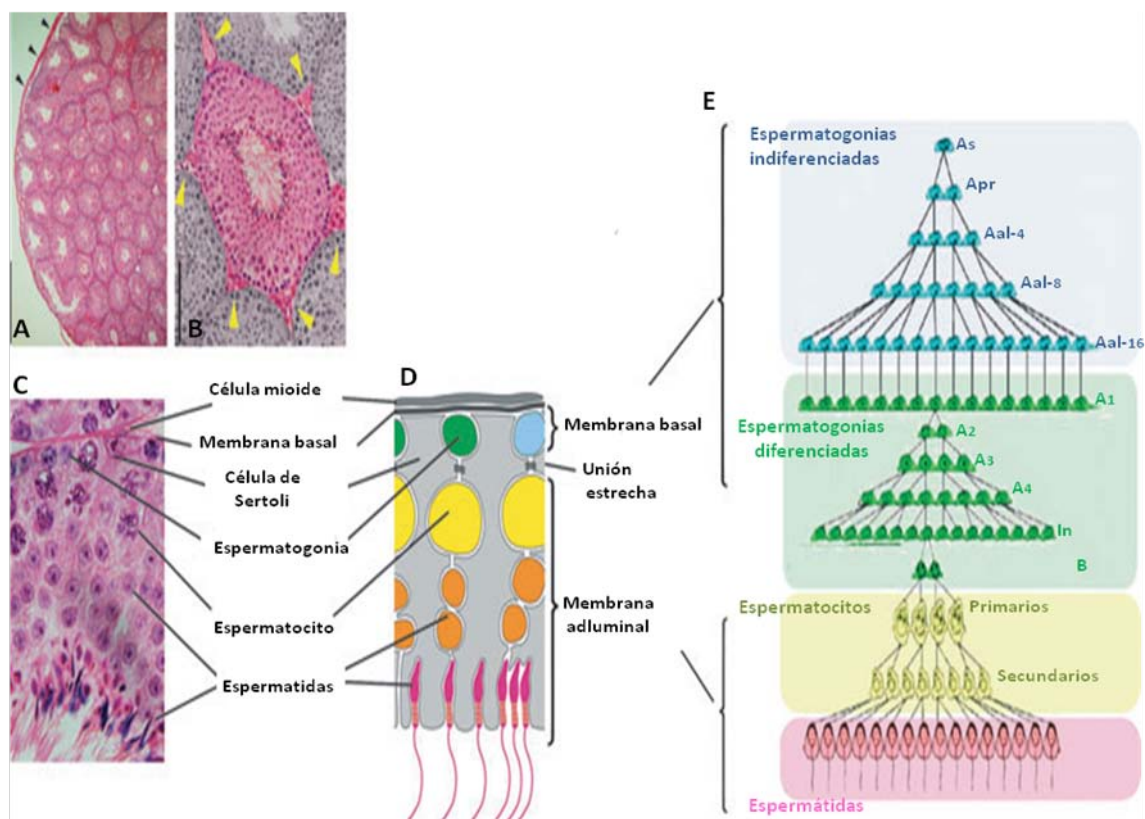


Figura 5. Anatomía del testículo y el proceso de espermatogénesis en el ratón. A) Sección testicular de un ratón maduro. Se observa numerosos túbulos seminíferos en sección transversal dentro de la túnica albugínea (Cápsula testicular mostrada con punta de flecha). B) Sección transversal de un túbulo seminífero rodeado por tejido intersticial incluyendo los vasos sanguíneos (punta de flecha amarilla). C y D) Organización de la espermatogénesis en el epitelio seminífero estratificado. E) Se muestra las poblaciones de células organizadas correspondientes a las etapas de la espermatogénesis. **Tomado y modificado del Yoshida, 2010.**

En la base del epitelio seminífero existen varias poblaciones de células (figura 6), y en la transición entre espermatogonia y espermatocitos interviene otro tipo celular de esta población; el proceso parece ser mediado por el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), secretado por las células de Sertoli presentes en el epitelio seminífero y el nivel de este factor determina si las espermatogonias en división se mantienen como espermatogonias o entran en la vía para llegar a ser espermatocitos (Gilbert, 2006).

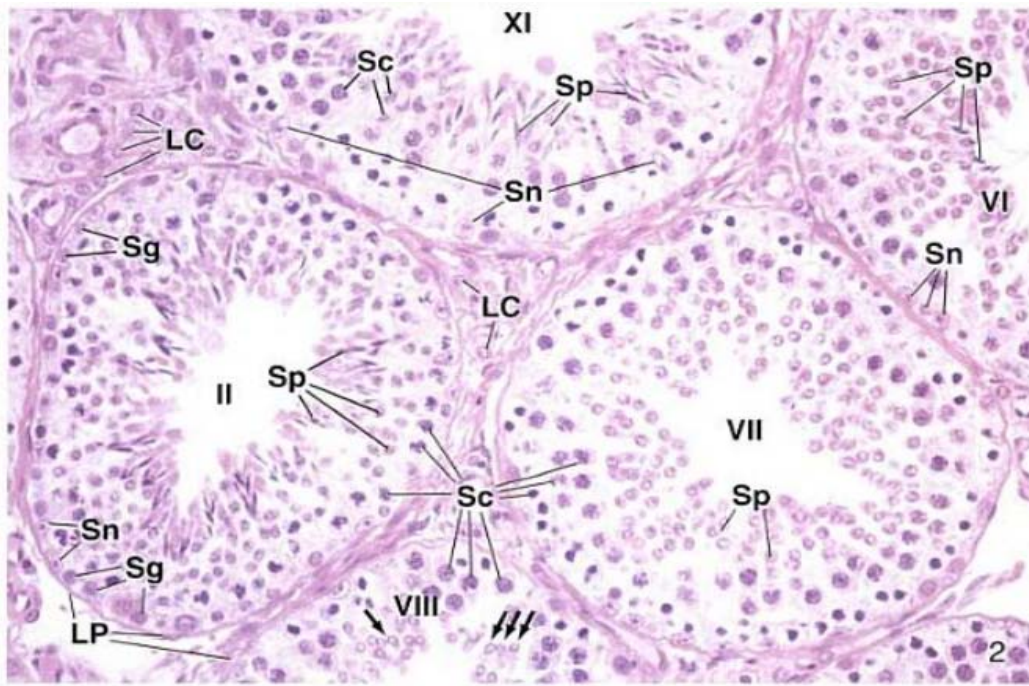


Figura 6. Corte histológico del testículo. Mostrando los diferentes tipos de células que constituyen el epitelio los túbulos semíferos, se puede observar las células de Leydig (LC), la lámina propia (LP), los espermatocitos (Sc), las espermatogonias (Sg), los núcleos de las células de Sertoli (Sn), las espermatidas (Sp). Tomado y modificado de Ross y Pawlina 2007.

Todas las espermatogonias están retenidas en la base del epitelio seminífero por prolongaciones entrelazadas en la base de las células de Sertoli, cuando los espermatocitos primarios completan la primera división meiótica, atraviesan la barrera de las células de Sertoli desplazándose hacia el interior del túbulo seminífero. Las prolongaciones de las células de Sertoli estrechamente unidas forman una barrera inmunológica entre las células espermáticas en formación y las del resto del cuerpo, incluidas las SSCs.

Una vez que ha comenzado la meiosis, las células espermáticas en desarrollo son diferentes inmunológicamente al resto del cuerpo (Carlson, 2009) originando un par de espermatocitos secundarios, que completan la segunda división meiótica dando lugar a células haploides llamadas espermátidas, las cuales mantienen una conexión entre sí a través de sus puentes citoplasmáticos. Durante las divisiones desde la SSC tipo A1 a espermátida, las células se mueven cada vez más lejos de la membrana basal del túbulo seminífero y se acercan a su cavidad. Ya cuando las células están diferenciadas a espermátidas se localizan en el borde de la cavidad y pierden sus conexiones citoplasmáticas y se diferencian en espermatozoides (Gilbert, 2006).

Las espermátidas haploide de mamífero son células redondeadas, sin flagelo que no se parece al espermatozoide maduro. Durante la diferencia del espermatozoide ocurren cambios en su estructura, dando como resultado una célula flagelada, con un núcleo aplanado y condensado, y con las mitocondrias formando un anillo alrededor de la base del flagelo.

Como fue mencionado anteriormente, el proceso de espermatogénesis comienza con las SSCs que son una población de células madre adultas autorrenovables capaces de

producir células progenies productoras de espermatozoides a lo largo de la vida del individuo (Caires y col., 2010), a esto se debe la importancia del estudio de las células madre de espermatogonias, puesto que el propósito principal de cualquier organismo superior con reproducción sexual es pasar sus genes a la siguiente generación vía sus células germinales primordiales, células madre del sistema reproductor. Así, la fecundación es un proceso complejo en donde la interacción gamética y el reconocimiento específico de la especie son pasos necesarios para el desarrollo del nuevo organismo (Guzmán, 2005).

La regulación, el establecimiento y el mantenimiento de la población de las células madre de espermatogonias esta mediado por factores de crecimiento y hormonas (Kubota y Brinster, 2006); la señalización de las células somáticas determina el destino de las células madre de espermatogonias, ya sea la diferenciación, autorrenovación o el inicio de la meiosis y producción de espermatozoides (Caires y col., 2010).

La continua producción de esperma en la naturaleza sexual del macho requiere de una eficiente y alta regulación del proceso en los túbulos seminíferos de los testículos. En muchas especies, este es un notable proceso productivo destacado por las especies que produce más de mil millones de espermatozoides cada día. Por lo tanto, un constante suministro de espermatogonias debe mantenerse de manera que estas células puedan diferenciarse en espermatozoides (Caires y col., 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios realizados sobre células madre de espermatogonias

El estudio de las células madre de espermatogonias se remonta a la década de 1950 (Clermont y Leblond, 1953, citado en Nagano, 2010), sin embargo, el análisis morfológico de estas células se limitan hasta 1994 cuando el grupo liderado por Ralph Brinster demostró la regeneración completa de la espermatogénesis después de un trasplante de células del testículo de ratón (Nagano, 2010). Este grupo encontró la regeneración aislando las CSSs de ratones donadores, estas células fueron sometidas a dos pasos de digestión enzimática, primero con colagenasa seguido con la enzima tripsina, las células obtenidas fueron trasplantadas directamente en dos grupos diferentes de ratones, en un grupo con una mutación que inhibe la espermatogenesis y en otro al cual se le indujo la infertilidad con un agente externo, el bisulfan, posteriormente se sacrificaron los animales aproximadamente a los 50 días, y se pudo mostrar la regeneración completa de la espermatogénesis en ambos grupos, sin encontrar diferencia significativa entre los dos grupos receptores (Brinster y Avarbock, 1994).

El cultivo de células madre de espermatogonias se logró por primera vez en 1998 por el grupo de Brinster utilizando el ratón como modelo de estudio. Aunque se trataba de un sistema en crudo en el que todas las células de los túbulos seminíferos fueron cultivadas en un medio que contenía suero fetal bovino, el estudio demostró que el mantenimiento de las células madre de espermatogonias fue posible a largo plazo, cuando son cultivadas sobre una capa de fibroblastos embrionarios. También se demostró que estas células se

dividen más eficientemente en ratones neonatos que en adultos (Nagano, 2010). Más adelante se desarrollo por primera vez un método que permite la proliferación y la diferenciación de las células de espermatogonias tipo A cultivando las células de los testículos de bovino de 5 meses de edad con medio mínimo esencial (MEM) suplementado con más de 2,5% de suero fetal bovino a 37°C (Izadiar y col., 2003).

Posterior al logro del establecimiento del cultivo de las SSCs, Izadyar y colaboradores desarrollaron un protocolo de criopreservación para las espermatogonias tipo A de testículos de ternera de 5 a 7 meses de edad, aislando las células con el uso de dos enzimas y manteniéndolas en medio MEM suplementado con suero de albumina de bovino, para ser criopreservadas con dimetil sulfóxido (DMSO) y sacarosa, además de medio mínimo, al cumplir con este proceso y posterior descongelamiento las células mostraron alta efectividad con un 70% de sobrevivencia (Izadyar y col., 2002). En la misma línea de investigación el grupo de Wyns evaluó exitosamente la supervivencia y actividad proliferativa de las SSCs y de las células de Sertoli luego de criopreservar partes del tejido testicular de niños de sexo masculino cercanos a la pubertad que padecían de cáncer; la criopreservación del tejido se realizó con DMSO suplementado con sacarosa y suero de albumina humana, y se evaluó con un xenoinjerto en ratones desnudos, proporcionando una técnica para preservar la fertilidad en niños masculinos sometidos a tratamientos oncológicos (Wyns y col., 2007). Luego Milazzo y colaboradores en el 2008, compararon diferentes condiciones para criopreservar el tejido testicular usando como modelo de estudio ratones neonatos, preservando el tejido con dos crioprotectores, el DMSO y el 1,2-propanediol (PROH), concluyendo que el procedimiento de congelación del tejido con

DMSO permite mantener no sólo su arquitectura, sino también la viabilidad de las células testiculares y las funciones endocrinas y exocrinas (Milazzo y col., 2008).

En el 2004 se logró establecer exitosamente células madre embrionarias a partir de testículos de ratón recién nacido, determinando que estas células son fenotípicamente similares a las células germinales embrionarias, salvo en su patrón de impronta genómica. Además las SSCs se pueden diferenciar en distintos tipos de células somáticas *in vitro* bajo condiciones utilizadas para inducir la diferenciación de células madre embrionarias. Las células fueron cultivadas en placas recubiertas por una película de gelatina, mantenidas con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB); cuando se le agregaron al cultivo los factores neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), inhibitorio de la leucemia (LIF), de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor básico de crecimiento de fibroblasto (bFGF), las células germinales formaron colonias únicas y las células madre proliferaron logarítmicamente, logrando producir espermatozoides normales luego de ser trasplantadas en los túbulos seminíferos de ratones infértiles (Kanatsu-Shinohara y col., 2004).

El factor SCF juega un papel esencial en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células germinales. En el 2007 se demostró que la adición exógena de SCF influye en la morfología de gonocitos humanos *in vitro*, además es capaz de desencadenar la formación de colonias de gonocitos en cultivo, caracterizados positivos para la fosfatasa alcalina, Oct-4 y C-kit. También se mostró que el SCF desempeña un papel en la supresión de la apoptosis de los gonocitos humanos. Cuando se bloquea la señalización de este factor las células en cultivo muestran características similares a la apoptosis, de la misma forma ocurre con las células cultivadas con un medio carente de este

factor. En conclusión el SCF actúa como un potente regulador de la determinación del destino de los gonocitos humanos (Tu y col., 2007). Así mismo ya se había demostrado por Pesce y colaboradores que la interacción SCF/C-kit contribuye a la adhesión de las células germinales priomordiales a las células somáticas en cultivo, y sugieren que el papel desempeñado por SCF en la promoción de la supervivencia, proliferación y migración de estas células tanto *in vivo* como *in vitro* podría depender de la capacidad de la membrana de la citoquina para mediar directamente la adhesión de las células germinales primordiales a las células somáticas que las rodean (Pesce, 1997).

Posteriormente De Rooij y Mizrak demostraron que las células madre de espermatogonias se pueden transformar en células pluripotentes que pueden diferenciarse en todos los derivados de las tres capas germinales, lo que ofrece nuevas posibilidades para el estudio de los mecanismos que regulan la diferenciación de las células madre utilizando como modelo de estudio el ratón (De Rooij y Mizrak, 2008).

He y colaboradores en el año 2009 usando diferentes marcadores como OCT-4 y c-KIT, pudieron determinar que las células madre de espermatogonias humanas comparten algunos, pero no todos los fenotipos con las células madre de espermatogonias de otras especies (He y col., 2010).

Por otra parte la diferenciación de células germinales murinas se ha logrado utilizando sistemas de cultivos tridimensionales. Stukenborg y colaboradores en el 2009, examinaron la influencia de dos matrices diferentes, agar suave y metil celulosa, demostrando en primera instancia que las células germinales masculinas pre-meióticas obtenidas de ratones neonatales pasan a través de la meiosis dentro de la matriz

completando la maduración, basadas en el soporte de las células somáticas testiculares y la presencia de gonadotropina.

Posteriormente en el año 2010 se realizaron dos estudios relevantes con las células madre de espermatogonias, uno realizado por Kanatsu-Shinohara y col. quienes lograron el establecimiento de un sistema de cultivo libre de suero en el que las células madre de espermatogonias de testículo de ratón se propagan a largo plazo; este sistema además de contener factores para la autorrenovación como GDNF, fue suplementado con fetuina que es una proteína de la sangre contenida en el suero fetal bovino, y moléculas asociadas a los lípidos requeridas para la proliferación de las células madre de espermatogonias *in vitro*. Estas células en cultivo proliferaron durante al menos 6 meses con una tasa comparable a la de un cultivo de células suplementado con suero y se pudo constatar que se completó el proceso de espermatogénesis después del trasplante de las células en los túbulos seminíferos de ratones infértiles, incluso llegándose a producir crías (Kanatsu-Shinohara y col., 2010).

Con base a las investigaciones sobre las señales sistémicas, endocrinas y locales del microambiente que estimulan las células somáticas para producir factores que contribuyen a la homeostasis de las células madre de espermatogonias en los mamíferos de diferentes especies, Caires y colaboradores concluyeron que además de su importancia para la fertilidad masculina, las células madre de espermatogonias representan un modelo para la investigación de las células madre adultas porque pueden ser mantenidas en cultivos y su funcionalidad puede ser determinada a través de un ensayo de trasplante (Caires, 2010).

Recientemente se logró por primera vez la producción de espermatozoides funcionales por métodos *in vitro*, lo que tiene una gran importancia en el campo de los cultivos de células de los testículos, ya que este proceso no se había podido reproducir en mamíferos fuera del organismo. Sato y colaboradores en el año 2011 mostraron que los testículos de ratón neonatal que contienen sólo gonocitos o SSCs primitivas como células germinales, pueden producir espermatidas y espermatozoides *in vitro*. La espermatogénesis fue mantenida en tejidos fragmentados incluidos en una matriz tridimensional y una interfase aire-líquido, comprobando su funcionalidad a través de la micro-inseminación de los espermátides y los espermatozoides obtenidos. El punto clave de esta investigación está basada en la reevaluación de los métodos de cultivo primario acorde al método estandarizado para fragmentos de tejido testicular en una interfase aire-líquido dentro de un gel de agarosa. La evaluación se realizó empleando dos líneas de ratones transgénicos, utilizando como control la línea portadora del gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), usada para el monitoreo de la espermatogénesis *in vitro* ya que es un marcador específico para células meiótica y haploides. Las células madre de espermatogonias aisladas del tejido de testículo de ratón de 7,5 a 10,5 días de nacidos, fueron mantenidas en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium) y se probaron diferentes factores que muestran efectividad para la promoción de la espermatogénesis en los testículos neonatales, como lo son el suero fetal bovino y la proteína supresora de Ras (KSR), obteniendo expresión del gen con ambos factores, con una diferencia significativa observándose con mayor intensidad la expresión con KSR, lo que significa que el progreso auténtico de la meiosis en cultivos del tejido testicular fue obtenido con esta proteína. Incluso se demostró de la misma forma, que se completo el proceso de espermatogénesis *in vitro* luego de la criopreservación del tejido. Pudiéndose

demostrar con esta investigación, que bajo estas condiciones se pueden encontrar rondas de espermatidas y células haploides *in vitro*, a partir de células madre aisladas del tejido de testículo de ratones neonatales. El desarrollo de este sistema *in vitro* va a permitir dilucidar parte de los mecanismos moleculares de la espermatogénesis, que hasta el momento se desconoce, además puede contribuir a desarrollar una técnica terapéutica para la infertilidad masculina.

3. JUSTIFICACIÓN

El propósito principal de cualquier organismo con reproducción sexual es pasar sus genes a la siguiente generación vía sus células madre del sistema reproductor, es decir, las células germinales; en vista de ello es necesario solventar los diferentes problemas que se pueden presentar en el momento de la reproducción por el daño o poca funcionalidad de este tipo celular, como es la infertilidad; estos problemas pueden tener origen tanto en el género femenino como en el masculino, teniendo en los humanos, menor porcentaje de exclusividad en este último según la Organización Mundial para la Salud (OMS), por lo que estudios que contribuyen a resolver los problemas generados por el género masculino son escasos. Aun siendo conocido que la principal causa en el género masculino se debe a defectos de los espermatozoides como lo son poca movilidad, forma inadecuada, producción insuficiente o ausencia total de estos, entre otras.

En virtud del conocimiento sobre estas células, 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, se ha planteado la posibilidad de estudiar su mantenimiento y caracterización en cultivo y la inducción a la diferenciación de las células madre de SSCs hacia su propio linaje *in vitro*. El logro de estos objetivos podría ser de gran utilidad para aclarar los mecanismos moleculares del proceso de espermatogénesis (Sato y col., 2011), además de demostrar el potencial que tienen estas células para ser la pieza central de una nueva era en la aplicación clínica para el tratamiento de la infertilidad y la medicina regenerativa (Kubota y Brinster,

2006) y de existir la posibilidad de desarrollar modificaciones en los protocolos que aumenten su efectividad con el fin de estar más cerca del su uso en terapias celulares aplicadas a seres humanos.

Debido a los pocos estudios desarrollados en la diferenciación *in vitro* de las células madre de espermatogonias, en este trabajo se plantea el problema de: si es posible la inducción a la diferenciación *in vitro* de las células germinales de testículo de ratón hacia su propio linaje por medio del uso de distintas estrategias inductoras.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

1. Caracterizar y determinar la diferenciación de las células germinales de testículo de ratón en condiciones *in vitro*.

4.2. Objetivos Específicos.

1. Aislar las células germinales provenientes de los testículos de ratón recién destetados por medio de disgregación enzimática y determinar la viabilidad celular.
2. Optimizar el sistema de cultivo de células madre de espermatogonias bajo diferentes condiciones *in vitro*.
3. Caracterizar las células germinales de testículos de ratón por técnicas de microscopia de luz, coloraciones histoquímicas e inmunohistoquímicas.
4. Inducir la diferenciación *in vitro* de las células germinales de testículo de ratón hacia su propio linaje celular, utilizando diferentes estrategias inductoras.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Ratones de la cepa NMRI de sexo masculino recién destetados, 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.

A los ratones se les realizó una disección en condiciones de asepsia, luego fueron sacrificados por una dislocación cervical, para la extracción de los testículos. Un grupo de los testículos se utilizó para establecer el cultivo primario de las células germinales y el otro para el procesamiento histológico para el análisis de las características morfológicas del tejido testicular.

5.2 Estudio histológico del testículo de ratón

Con esta técnica se busca fijar y colorear una muestra para su estudio visual procurando no alterar su estado natural. Para realizar los cortes se fijó la muestra con formol al 10% en PBS por aproximadamente una semana, con el fin de preservar el tejido deteniendo la autólisis, y de esta forma el tejido se endurece ligeramente pero sin fragmentarse permitiendo que las estructuras permanezcan en una disposición muy similar al estado *in vivo* (Cediel, 2009). Luego se deshidrató con una batería creciente de etanol, se aclaró la muestra con tolueno que es uno de los agentes que reemplaza al etanol, siendo además miscible a la parafina, para luego incluirla en parafina y realizar los cortes en

secciones de 5 micras de espesor, las secciones obtenidas se les realizó una coloración de rutina Hematoxilina-Eosina descrita anteriormente.

5.3 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. El material biológico sobrante fue descartado según el reglamento del laboratorio.

Los testículos de ratón obtenidos por la disección del animal, mantenidos en solución buffer fosfato libre de calcio y magnesio (PBS) fueron trasladados en una capsula de Petri cerrada a una campana de flujo laminar vertical para el montaje del cultivo primario. Una vez en la campana se eliminó el tejido adiposo y el epidídimo para evitar la contaminación del cultivo con otro tipo celular, además se le desprendió cuidadosamente la túnica albugínea. Posterior a esto el material fue disgregados mecánicamente utilizando tijeras finas hasta obtener cortes de aproximadamente 2 mm, para la realización de la disgregación enzimática.

5.3.1 Disgregación enzimática

Para la disgregación enzimática de los trozos de tejidos de los testículos de ratón fueron sometidos a la acción de una solución de tripsina 0,25% (GIBCO) en base de PBS mezclada con una solución de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,04% (J. T. Baker Chemicals) 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 bovino (SFB), 100 $\mu\text{m}/\text{mL}$ de Estreptomicina y 100 U/mL de Penicilina (Kossack y col., 2009), desde ahora llamado medio nutritivo; la suspensión celular obtenida se centrifugó a 724,5 g por 10 minutos (3 veces) y el taco celular fue resuspendido en medio nutritivo para luego ser sembrado en placas de plástico cuya área dependió de la cantidad de células viables obtenidas, determinada por medio del colorante azul Tripiano (B. D. H.) y el uso de una cámara de Neubauer también conocida como hemocitómetro (BOECCO) (Freshney, 2000).

Los cultivos primarios fueron mantenidos en incubación en atmosfera húmeda de 5% de CO_2 a 37°C, y el medio fue reemplazado cada dos o 3 tres días dependiendo de los requerimientos del cultivo, hasta la confluencia de las células en monocapa. Todo el procedimiento de aislamiento, establecimiento y mantenimiento del cultivo se realizó en condiciones de asepsia trabajando en campanas de flujo laminar vertical.

5.4 Subcultivos celulares

Los cultivos celulares primarios fueron sometidos a un proceso de tripsinización, al observarse confluencia de un 80-90%. El proceso de tripsinización consistió en someter a las células en cultivo a la acción de una solución de Tripsina-EDTA en una proporción 1:1 y concentración 0,125%-0,02% respectivamente, incubándolo a una atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C por 5 minutos. Luego de verificar bajo microscopio de luz invertido que las células se disociaron completamente, se inactivó la enzima agregando a la mezcla medio nutritivo y la suspensión celular se centrifugó a 724,5 g por 5 minutos, el taco celular se resuspendió en medio nutritivo y se realizó el conteo celular, para ser sembradas en frascos de cultivo como fue descrito anteriormente (Urbaneja y col., 1975).

Los subcultivos fueron mantenidos de la misma forma y bajo las mismas condiciones que los cultivos primarios descritos en el apartado de aislamiento, establecimiento y mantenimiento del cultivo primario de células germinales de testículo de ratón.

La morfología y el crecimiento celular se evaluó microscópicamente con un microscopio invertido de contraste de fase Olympus IX50 que se encuentra acoplado a una computadora y los registros de los experimentos fueron tomados por el programa TV TUNER (Araos, 2008).

5.5 Ensayos de proliferación

5.5.1 Curva de crecimiento

Para realizar la curva de crecimiento se sembraron 50.000 células en placas de 35 mm (NUNC) en un sistema de cultivo en monocapa y se contaron las células viables a través de la determinación con el colorante de exclusión azul Tripano, utilizando un hemocitómetro (BOECCO). Luego se realizó una curva de crecimiento que permite reconocer el óptimo crecimiento y mantenimiento de las células en cultivo. La curva se realizó a los 3, 6 y 9 días de cultivo, con un $n=2$, para ello se sometieron las células al proceso de tripsinización descrito anteriormente y se mezclaron 20 μ l de la muestra con 20 μ l de colorante de exclusión azul Tripano.

5.5.2 Ensayo del MTT

La proliferación celular *in vitro* se determinó mediante el ensayo MTT, cuyo principio se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol 2y1)-2,5 bromuro de Difenil tetrazolium, debida a la acción de la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial de las mitocondrias activas, formando un cristal con una coloración azul-

violeta que queda atrapado en el interior celular, llamado formazán. La presencia del colorante es proporcional al número de células metabólicamente activas (Mosmann, 1983). El formazán es soluble en el solvente orgánico Dimetil Sulfoxido (DMSO, Scharlav). Este ensayo permite cuantificar el crecimiento celular a través de la densidad óptica, por medio de un espectrofotómetro (Araos, 2008).

Para realizar este ensayo se utilizaron placas de 24 pozos como superficie de cultivo una suspensión de aproximadamente 2000 células provenientes del cultivo primario, manteniéndolos incubados bajo las mismas condiciones de los cultivos celulares. A los 3, 6 y 9 días de cultivo se descartó el medio y se agregó 50 μ L de MTT (Reasearch Organics) a una concentración de 0,4 mg/mL en solución de PBS, incubándolas a 37°C, a una atmosfera de 5% de CO₂ por 3 horas. Luego se descartó el MTT y se agregó 100 μ L de DMSO en oscuridad, determinando posteriormente la densidad óptica en un espectrofotómetro (STAT FAX-2100, Awarenexx inc.) a una longitud de onda de 545 nm (Mossman, 1983).

Los datos obtenidos en el ensayo son presentados como media $\pm$ SD para cada tiempo de cultivo. El análisis estadístico se realizará por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar la diferencia significativa entre las medias y de esta forma se indicará el comienzo de la fase log y/o de la fase estacionaria, utilizando un nivel de significancia $p < 0,05$ y $n = 24$.

5.6 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 como la coloración de rutina MayGrünwald-

Giemsa y la coloración con ácido peryódico de Schiff, determinaciones inmunohistoquímicas e histoquímica de Lectina.

5.6.1 Evaluación morfológica

Se llevaron a cabo observaciones periódicas al microscopio invertido de contraste de fases de los cultivos en monocapa para llevar el seguimiento del comportamiento de las células en cultivo como la adhesión, formación de agregados y la determinación cualitativa de la proliferación celular.

5.6.2 Evaluación histoquímica

La coloración histoquímica es una técnica para la caracterización morfológica de las células cultivadas, la cual se basa en una tinción diferenciada del citoplasma y el núcleo de las células. Para la evaluación histoquímica se realizaron coloraciones histológicas de rutina May Grünwald-Giemsa, coloraciones con el ácido peryódico de Schiff, Hematoxilina-Eosina e histoquímica de Lectina.

5.6.2.1 Coloración MayGrünwald-Giemsa

Esta coloración se realizó debido a que permite la visualización de las células (Sharp, 1980). El procedimiento se llevo a cabo fijando las células adheridas a la superficie de cultivo con Metanol al 100%, luego se agregó el colorante MayGrünwald (MERCK), lavando el exceso colocando la lámina de forma invertida invertida en una placa preparada para este fin y se agregó en el espacio existente entre la lámina y la placa, el colorante Giemsa (MERCK) diluido previamente con agua destilada 1:18 y filtrado para evitar la precipitación del colorante, posteriormente se deshidrataron las laminas haciéndolas pasar

por una batería de acetona-Xilol en las proporciones 1:0, 2:1, 1:2 y 0:1 respectivamente, para luego realizar un montaje permanente en medio resinoso (entellan) (Urbaneja y col, 1975).

5.6.2.2 Coloración con ácido peryódico de Schiff

La coloración con ácido peryódico de Schiff (PAS) permite determinar la cantidad de glucógeno y carbohidratos presentes en las células en cultivo. Para la realización de este ensayo se hidrató la muestra, haciéndola pasar por una batería de alcoholes hasta llegar al agua destilada, posteriormente se oxidó en la solución de ácido peryódico durante 5 minutos lavando con agua destilada. Se colocó el reactivo de Schiff de Coleman por 15 minutos y se lavó por 10 minutos con agua corriente tibia. Luego se contrasto con la solución de Hematoxilina de Meyer durante 15 minutos y se lavó con agua corriente.

5.6.2.3. Coloración Hematoxina-Eosina

Esta tinción permite distinguir los componentes ácidos y básicos de la célula. Los colorantes ácidos poseen cargas negativas que tienden a teñir las sustancias cargadas positivamente, consideradas eosinófilas, como el citoplasma celular y los colorantes básicos cargados positivamente y tienen afinidad con las sustancias con carga negativa como el núcleo de la célula y son consideradas basófilas. La coloración consiste en hacer pasar la muestra primero por Hematoxilina, luego por agua corriente y por etanol al 50%, seguidamente se dejará la muestra en Eosina.

5.6.2.4 Histoquímica de Lectina

Para la evaluación mediante histoquímica de lectina se fue utilizada 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). Para ello se hidrató la muestra y se incubó con peróxido de hidrógeno por 5 minutos para bloquear la peroxidasa endógena, luego se lavó con solución buffer trisfosfato (TBS) con cationes (NaCl, CaCl_2 y MgCl_2) para ser incubado con la lectina DBA a una concentración de 10ng/mL, durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de transcurrido este tiempo se lavó nuevamente con TBS con cationes y se reveló con diaminobencidina (DAB) con peróxido de hidrógeno por 20 minutos y se contrastó con hematoxilina de Mayer.

5.6.3 Determinación inmunohistoquímica

La caracterización de las células germinales por medio de la determinación inmunohistoquímica se basa en la reacción antígeno-anticuerpo que puede ser observada, consiste en que la célula se vuelva permeable, para que las moléculas del anticuerpo (inmunoglobulinas) puedan ingresar en ella y unirse a un antígeno el cual es toda molécula que estimule la producción de anticuerpos. Es una sustancia química, generalmente proteica de elevado peso molecular, capaz de activar positiva o negativamente al sistema inmune en cualquiera de sus respuestas.

Para lograr este cometido se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-vimentina, que reconoce la vimentina en los filamentos intermedios del citoplasma de las células de Sertoli revelando con el kit del sistema SC-2050 (Santa Cruz Biotechnology) el cual realiza una coloración indirecta basada en la interacción del complejo Estreptavidina-

Biotina con el revelador DAB. El procedimiento se inició con la inactivación de la peroxidasa endógena añadiendo la solución bloqueadora (peróxido de hidrogeno) dejándola por 10 minutos y se lavó con PBS, descartando el exceso de la solución. Seguidamente se agregó el suero bloqueador dejándolo actuar, después de esto se aspiró el suero y se incubó con el anticuerpo primario diluido previamente a 5 µg/mL en PBS, se lavó nuevamente con PBS y incubó la muestra con el anticuerpo secundario biotilnado por 30 minutos y se lavó con PBS eliminando el exceso de líquido. Luego se agregó el complejo HRP-Estreptavidina por 30 minutos lavándolo con PBS, luego se añadió el sustrato de la peroxidasa HRP preparado previamente, con agua desionizada, sustrato buffer concentrado al 10%, cromógeno DAB y sustrato de peroxidasa concentrado al 50%. Esta solución se dejó actuar hasta que se desarrolló una coloración ligeramente marrón y se lavó con agua desionizada, contrastando las muestras con hematoxilina lavándola posteriormente con agua desionizada.

5.7 Inducción a la diferenciación de las células germinales *in vitro* hacia su propio linaje

Para la inducción a la diferenciación de las células germinales de testículo de ratón hacia su propio linaje se utilizaron dos sistemas de cultivo, la primera se realizó cultivando las células en monocapa como fue descrito anteriormente y la segunda incluyendo fragmentos de tejidos en una matriz tridimensional de colágeno tipo I extraído de la cola de la rata según la metodología de Van Bockmeer y Clayton (1982), la matriz se realizó a una concentración teórica de 15 mg/mL de colágeno. Además se utilizó como estrategia inductora suplementar el medio nutritivo con el factor de células madre (SCF) a una concentración de 100 ng/mL en solución PBS para ambos sistemas de cultivo.

En la inducción en cultivo tridimensional las células de testículo de ratón *in vitro* fueron incluidas en los geles de colágeno. Para ello las células fueron mezcladas con el colágeno a una densidad de 1.000.000 por gel en placas de 35 mm (Merentes, 2009). A estos cultivos se le añadió medio nutritivo con el factor SCF para analizar su efecto sobre la diferenciación de las SSCs, y se colocó en interfase aire-líquido, en una placa de cultivo, teniendo como control cultivos en ambos sistemas con medio nutritivo sin el factor. Los cultivos fueron mantenidos durante 15 días en atmosfera húmeda 5% de CO₂ a 37°C y se le realizó cambios de medio periódicamente, realizando observaciones bajo el microscopio invertido y tomando los registros correspondientes hasta la posterior evaluación histológica fijando los geles con formalina al 10% durante 7 días.

5.7 Evaluación histológica e histoquímica de la inducción a la diferenciación celular de las células germinales.

La evaluación de la diferenciación de las células germinales, tanto en los cultivos en monocapa como en los tridimensionales se realizó histológica e histoquímicamente, mediante la coloración histológica Hematoxilina-eosina, histoquímica de Lectina y la coloración histoquímica PAS, de la misma forma y bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Para la evaluación de la inducción a la diferenciación de las matrices tridimensionales se realizaron cortes histológicos de la misma forma como se realizaron los cortes del órgano completo en el apartado 5.2.

5.8 Criopreservación de las células germinales

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas disminuyendo las funciones vitales de una célula y poderlas mantener en condiciones viables por un tiempo prolongado para estudios futuros (Ávila y col., 2006). Para realizar el proceso de criopreservación fue necesario tripsinizar el cultivo celular de la misma forma y bajo las mismas condiciones descritas anteriormente con la variante de que el taco celular obtenido se resuspendió en medio de congelación que contiene suero fetal bovino y glicerol 10% mantenido a 4°C, esta solución fue transferida a un criotubo, el cual envolviendo bien para asegurar que la congelación sea gradual y evitar un enfriamiento brusco que pueda dañar las células, la muestra se incubó primero a una temperatura de -20°C, luego a -70°C y por ultimo dejarlas por 30 días en nitrógeno líquido. Además se preservaron las células por medio del método de vitrificación que consiste en la reducción brusca de la temperatura por un proceso termodinámico en el cual un fluido aumenta la viscosidad de la muestra durante el enfriamiento, adquiriendo las propiedades de un sólido (Palma, 2001); para realizar la vitrificación luego de la tripsinización se resuspendió el taco celular en 50 µL de la solución de equilibrio constituida por 20% de etilenglicol en PBS, por 5 minutos y luego se mezcló con 500 µL de la solución de vitrificación que contiene 40% de etilenglicol, 18% de ficoll y sacarosa (0,3M) por 40 segundos. Las células resuspendidas se colocaron en un criotubo y se colocaron directamente en nitrógeno líquido (He y col., 2010).

Para evaluar el efecto del procedimiento sobre este tipo celular, en el caso de la congelación se descongeló la suspensión celular colocando el criotubo en un baño de María a 37°C hasta observar que la solución esta descongelada, luego se lavó y se resuspendió en medio nutritivo para ser centrifugada a 724,5 g por 5 minutos, resuspendiendo nuevamente el

taco celular obtenido en medio nutritivo para ser sembradas en placas de cultivo y posterior evaluación.

En el caso de la vitrificación para aumentar la temperatura de la muestra, se colocó en baño de María a 37°C, se lavó la muestra, se resuspendió en PBS con 20% de SFB y sacarosa 0,5M, luego se centrifugó a 724,5 g; el taco celular obtenido fue resuspendido en medio nutritivo y se sembró en placas de cultivo para la evaluación de la adhesión al sustrato y proliferación (Moon y col., 2008).

5. RESULTADOS

A continuación expondremos una serie de resultados correspondientes a el establecimiento y caracterización de los cultivos primarios y subcultivos de las células de testículo de ratón, luego se muestra la capacidad de proliferación celular y de la diferenciación celular *in vitro* usando diferentes sistemas de cultivos, evaluando además la influencia del SCF y por último serán presentados los resultados de la criopreservación y la viabilidad celular luego de la descongelación.

6.1 Corte histológico del testículo de ratón recién destetado.

El corte histológico mostrado en la figura 7, se realizó para determinar las características histológicas del testículo de ratón recién destetado de 21 días aproximadamente, en donde se puede apreciar que este órgano está organizado en túbulos seminífero, rodeado por una túnica albugínea (Fig. 7-A). Las paredes de los túbulos están rodeadas por una membrana basal e inmediatamente se encuentra una capa de células mioideas peritubulares con morfología fusiforme (Fig. 7-B). Cada túbulo seminífero está constituido por un epitelio estratificado compuesto por células con variedad fenotípica, en la figura 7-B se puede observar diferentes estadios de las células espermátogénicas, como las espermátogonias con morfología redondeada que presentan un gran núcleo ovoide muy basófilo y un citoplasma escaso, estas células se localizan en la base del epitelio seminífero ubicadas una al lado de la otra conectadas a través de puentes citoplasmáticos; a medida que se van diferenciando se van alejando de la base del túbulo seminífero acercándose al

lumen de este, manteniendo las conexiones citoplasmáticas. También se encuentran los espermatocitos primarios que se pueden distinguir por poseer mayor proporción de citoplasma que las espermatogonias y presentan un gran núcleo ovoide (Fig. 7-B).

Otro tipo celular que forma parte del epitelio seminífero son las Células de Sertoli (no se logra apreciar en la figura), estas células no espermatogénicas descansan sobre la membrana basal y su citoplasma es muy irregular y se extiende hasta el lumen del túbulo, por tanto poseen un amplio citoplasma que se ramifica por todo el grosor del epitelio rodeando a todas las células espermatogénicas poseen un núcleo oval orientado hacia la membrana basal.

Además en la figura 7-C se puede apreciar 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.

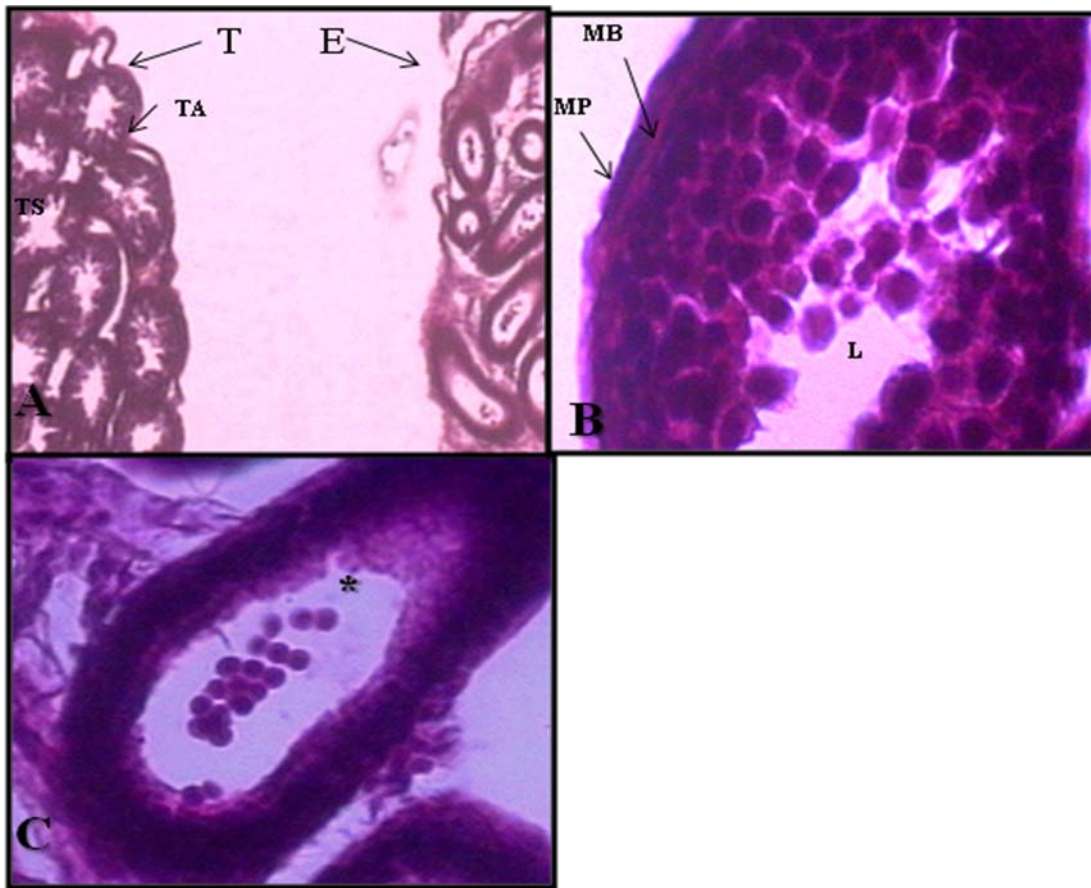


Figura 7. Corte histológico de testículo de ratón recién destetado. A) se puede observar una parte del testículo (T) rodeado por una túnica albugínea (TA), constituido por los túbulos seminíferos (TS). Además se observa el epidídimo (E). Aumento 200x. B) Se observa en detalle un túbulo seminífero mostrando diferentes estadios celulares de la espermatogenesis y así como las células mioides peritubulares (MP) y la membrana basal (MB). Aumento 400x. C) Se muestra en detalle una parte del epidídimo en cuyo lumen (*) se observan células espermatozonias. Aumento 400x. Coloración Hematoxilina-Eosina.

6.2 Establecimiento del cultivo primario y subcultivo de las células germinales de testículo de ratón.

En los cultivos primarios de células de testículo de ratón se observó una población celular heterogénea, como lo muestra la figura 8, observándose en general tres morfologías diferentes (Fig. 8-A); unas células con un citoplasma irregular extendido similares a las células somáticas del testículo específicamente a las células de Sertoli (Fig. 8-B), estas

células se adhieren fácilmente a la superficie de cultivo formando una monocapa confluyente junto con unas células alargadas tipo fusiforme similares a las mioides peritubulares. El tercer tipo celular que se observa son células con morfología redondeadas similares a las células de espermatogonias (Fig. 8-C) que generalmente crecen por encima de la monocapa formada por las células somáticas.

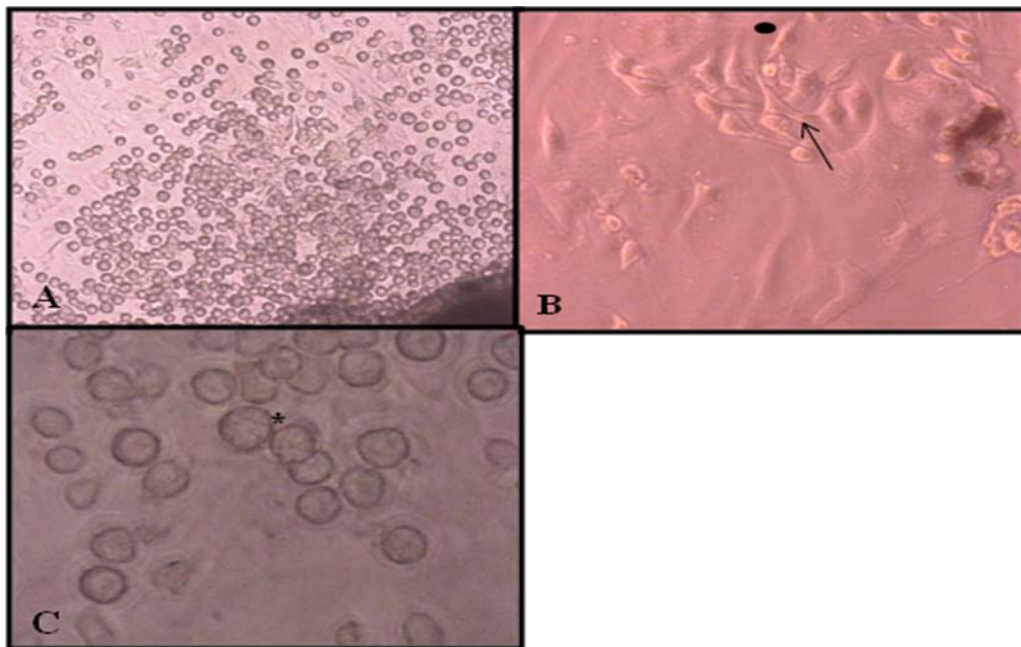


Figura 8. Poblaciones celulares obtenidas por disgregación enzimática con Tripsina-EDTA. Cultivo primario de 20 días. A) Se observa una heterogeneidad celular. Contraste de fases. 200X. B) Detalle de células con citoplasma irregular extendido similares a las células de Sertoli (→) y células alargadas similares a las mioides peritubulares (●). Contraste de fases. 400X. C) 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, que de igual forma generalmente crecen sobre la monocapa de células somáticas (Fig. 9).

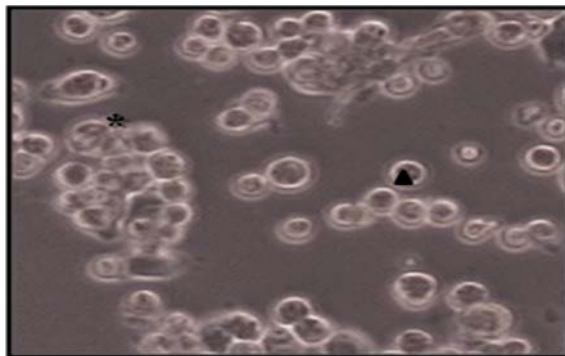


Figura 9. Tipos de colonias formadas por las células redondeadas similares a espermatogonias. Se observa un grupo de células alineadas formando una colonia en hilera (▲) y otros grupos formando agregados celulares tipo globular (*). Contraste de fases. 200x.

Los cultivos primarios de células de testículo de ratón tuvieron una alta proliferación y alcanzaron generalmente la confluencia a los 20 días de haberse establecido el cultivo. Una vez alcanzada la confluencia se subcultivaron, pudiéndose mantener los subcultivos entre 15 y 20 días, dentro de este periodo mostraron una alta proliferación. Al inicio de los subcultivos se observaron una alta proporción de células aisladas, manteniéndose los tres tipos de morfologías señalados anteriormente (Fig. 10), a medida que transcurre el tiempo de cultivo las células somáticas se adhieren al sustrato y las células similares a las espermatogonias formaron las colonias previamente descritas creciendo sobre las células somáticas.

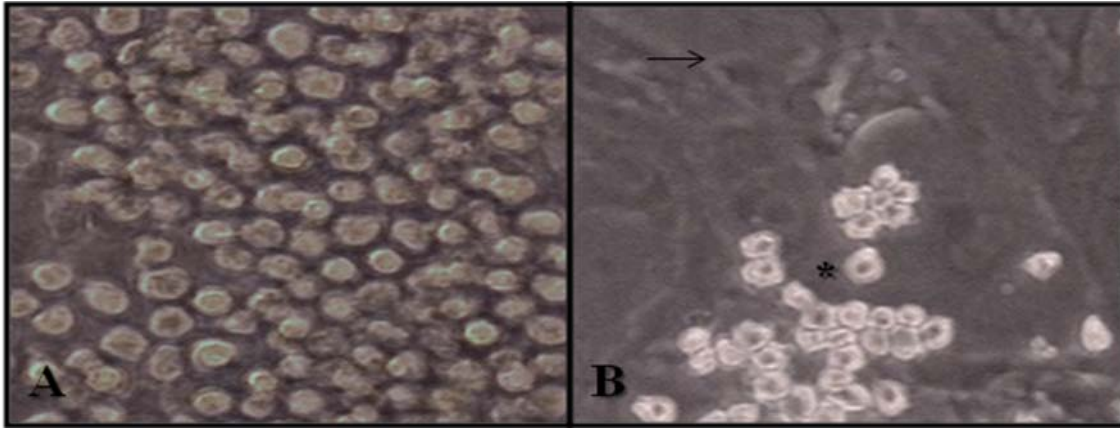


Figura 10. Subcultivo de células de testículo de ratón. A) Se observan un conjunto de células germinales aisladas. 6 días de cultivo. Contraste de fases. 400x. B) Se puede apreciar células somáticas adheridas a la superficie de cultivo (→) y células similares a las espermatogonias agrupadas (*). 19 días de cultivo. Contraste de fases. 200x.

6.3 Características histológicas e inmunohistoquímica de los cultivos primarios y

subcultivos de células de testículo de ratón.

Las poblaciones heterogéneas de las células provenientes de testículo de ratón cultivadas en monocapa mostraron los tres fenotipos diferentes descritos anteriormente, células similares a las células de Sertoli, las similares a las mioides peritubulares y las similares a espermatogonias. Los cultivos primarios fueron observados periódicamente bajo el microscopio invertido de contraste de fases a medida que fueron pasando los días de cultivo, los cuales mantuvieron las diferentes morfologías con el transcurso del tiempo (Fig. 11- A, B y C), las células con morfología similar a las espermatogonias que tienen un gran núcleo con escaso citoplasma y se conectan e interactúan a través de puentes citoplasmáticos; también se observaron que algunas de estas células fueron cambiando un poco su morfología aproximadamente a los 10 días de cultivo (Fig. 11- D), observándose este tipo celular con una morfología más bien alargada, (Fig. 11-E) que podrían ser

espermátidas, a los 18 días de cultivo se observa una monocapa confluyente con diferentes morfologías celulares (Fig. 11-F).

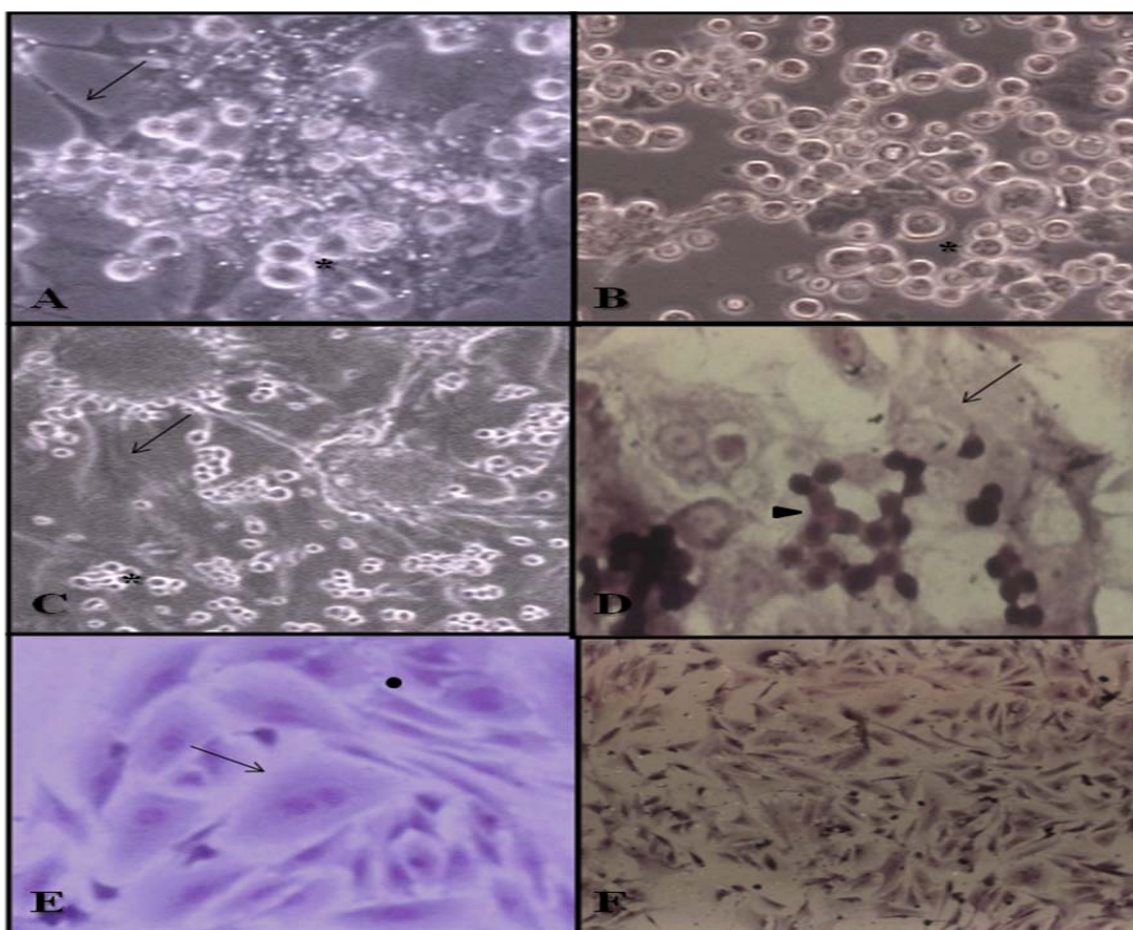


Figura 11. Cultivos primarios de células de testículo de testículo de ratón recién destetado. A) Se muestra un cultivo de 3 días en donde se observa una monocapa de células somáticas (→) y células con morfología similar a las células tipo espermatogonia (*). Contraste de fases. 400x. B) Cultivo de 10 días donde se observa una alta proporción de células similares a las espermatogonias (*). Contraste de fases. 400x. C) Cultivo confluyente de 18 días en donde las células somáticas (→) forman una monocapa, observándose las células similares a espermatogonias (*) resfringentes que crecieron sobre ellas. Contraste de fases. 200x. D) Cultivo de 3 días donde se puede apreciar las células somáticas (→) y las células similares a espermatogonias (*), estas últimas conectadas a través de puentes citoplasmáticos (▶). MayGrünwald-Giemsa. 400x. E) Se muestra un cultivo de 10 días en donde se observan células somáticas (→) y células alargadas similares a las espermatidas alargadas (●). Hematoxilina-Eosina. 400x. F) Cultivo de 18 días donde se observa una monocapa confluyente con una gran proporción de células somáticas y algunas células espermatogénicas. MayGrünwald-Giemsa. 100x.

De igual forma se caracterizaron histoquímicamente los cultivos primarios con la lectina DBA y con el PAS (Fig. 12), con lo que se pudo comprobar la presencia de células espermatogénicas en los cultivos. Con la histoquímica de Lectina se observó un marcaje en las células similares a las espermatogonias, mientras que las células que pudieran ser somáticas no mostraron marcaje (Fig. 12-A), en detalle se puede observar claramente las diferentes intensidades del marcaje según la morfología de las células, las células mas redondeadas mostraron un mayor marcaje y se puede evidenciar la presencia de un núcleo prominente con un nucléolo, también se puede observar una vacuola en esta zona, característico de las espermatogonias más indiferenciadas, estas células presentan escaso citoplasma, mientras que otras células también marcadas pero en menor intensidad presentan forma alargada, con mayor cantidad de citoplasma y el núcleo desplazado hacia un extremo, estas células son similares a las espermátidas alargadas (Fig. 12-B).

Con la coloración con el PAS se pueden distinguir las células espermatogénicas, las cuales son PAS-positivas mostrando una coloración rosa en la determinación histoquímica mientras que las células somáticas no reaccionaron 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 (Fig. 12-C), también se puede observar los puentes citoplasmáticos que conectan unas células espermatogénicas con otras de la misma morfología, agrupadas formando colonias en hilera y agregados celulares tipo globular, en detalle se pueden apreciar células somáticas negativas a la reacción del PAS que presentan un núcleo con un nucléolo y el citoplasma extendido (Fig. 12-D).

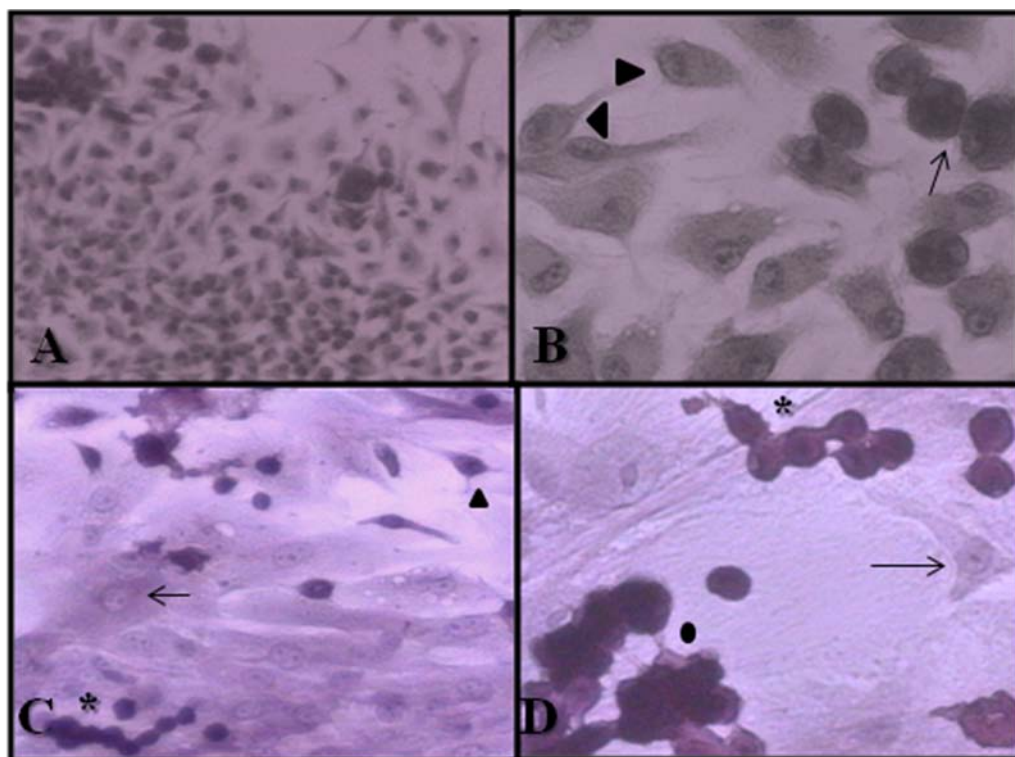


Figura 12. Cultivos primarios de células de testículo de ratón caracterizados histoquímicamente. A) Cultivo de 20 días marcado con la lectina DBA en donde se observa numerosas células similares a espermatogonias marcadas. 200x. B) Detalle de las células similares a espermatogonias marcadas con la lectina, se observan células redondeadas con marcaje intenso en el núcleo, con un vacuola en este y pudiéndose distinguir además el nucléolo (—→), también se observan células con menor marcaje, alguna de ellas presentando forma alargada con el núcleo desplazado hacia un extremo (▶). 400x. C) Cultivo de 20 días coloreado con el PAS, se puede observar las células espermatogénicas con una leve coloración rosa alineadas formando una colonia en hilera (*), otras células en forma alargada similares a espermátidas con un menor coloración (▶) y células somáticas Pas-negativas (—→). 200x. D) Detalle de las células similares a espermatogonias 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 (—→)PAS. 400x.

En cuanto a la interacción de las células similares a espermatogonias con las células somáticas se puede observar en la figura 13-A algunas células similares a espermatogonias con una intensa reacción al PAS, interactuando con las células somáticas (PAS-negativas)

aparentemente una célula de Sertoli, a través de conexiones citoplasmáticas, además se puede observar una célula alargada con un núcleo central similar a las células mioides peritubulares (Fig. 13-B) y una célula PAS-positiva similar a una espermátida, esta célula se muestra con una forma alargada y se puede distinguir claramente el núcleo prominente con un nucléolo (Fig. 13-C).

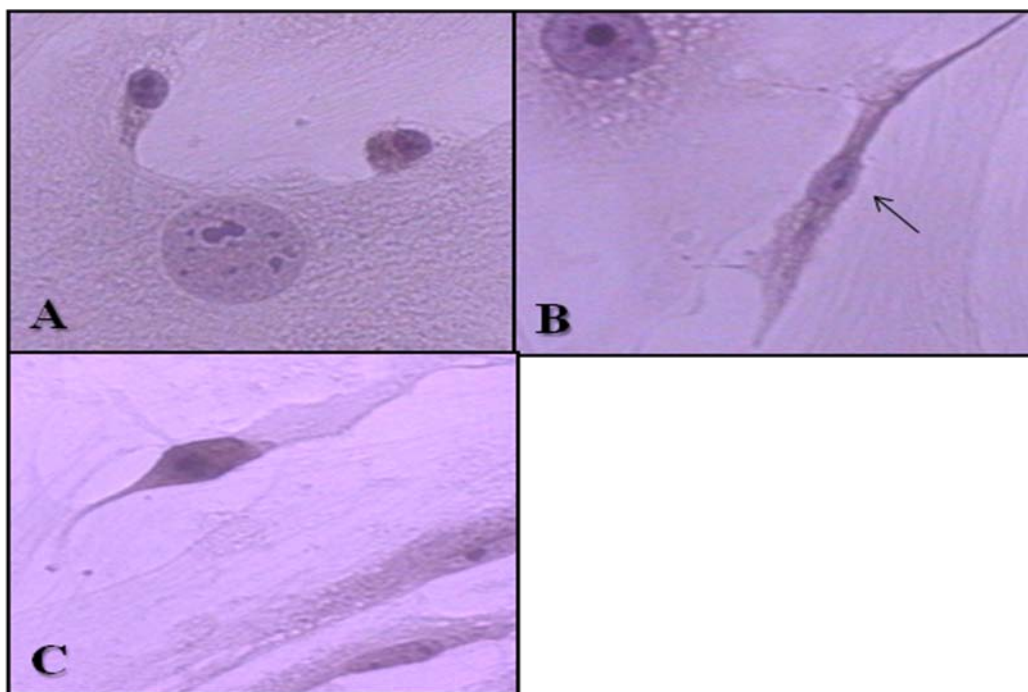


Figura 13. Cultivo de células de testículo de ratón de 15 días con PAS. A) Se observa la interacción de dos células similares a espermatogonias PAS-positivas con una célula somática aparentemente una célula de Sertoli, mostrando un gran núcleo y un citoplasma extenso. B) Se observa una célula alargada con un núcleo central y citoplasma extendido similar a una célula mioide peritubular (→). C) Se observa una célula con reacción positiva al PAS de morfología largada similar a una espermátida. Aumento 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 14 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.

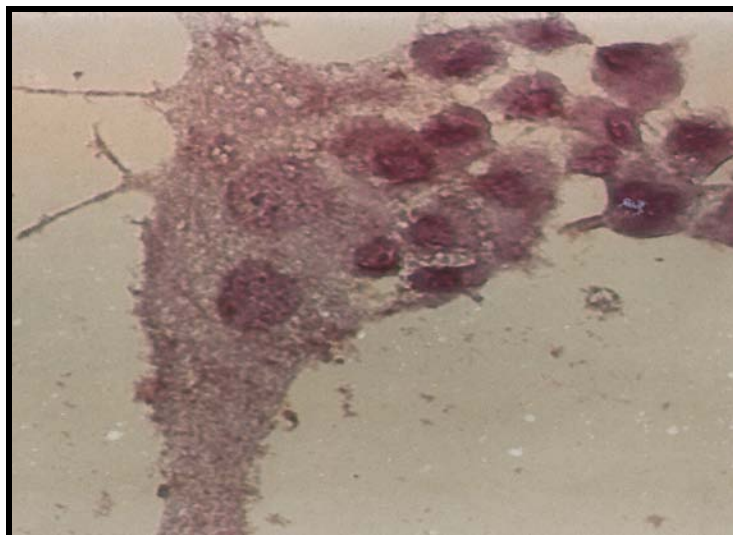


Figura 14. Cultivo de células de testículo de ratón de 6 días marcado inmunocitoquímicamente con el anticuerpo anti-vimentina. Se observa solo el marcaje positivo a la vimentina de una célula binucleada con gran extensión del citoplasma interactuando con las células similares a las espermatogonias. 400x.

6.4 Cinética de las células en cultivo

El crecimiento celular se determinó utilizando dos métodos, uno cuantificando las células viables en el cultivo a través del colorante de exclusión azul tripano y el otro por el método del MTT. La figura 15 muestra el crecimiento de las células de testículo de ratón en cultivo, donde se puede observar una fase logarítmica, evidenciándose un crecimiento exponencial desde el inicio hasta los 3 días de cultivo en donde se va atenuando el crecimiento hasta los 6 días, evidenciado por un crecimiento no significativo después del cual se alcanza una aparente fase estacionaria.

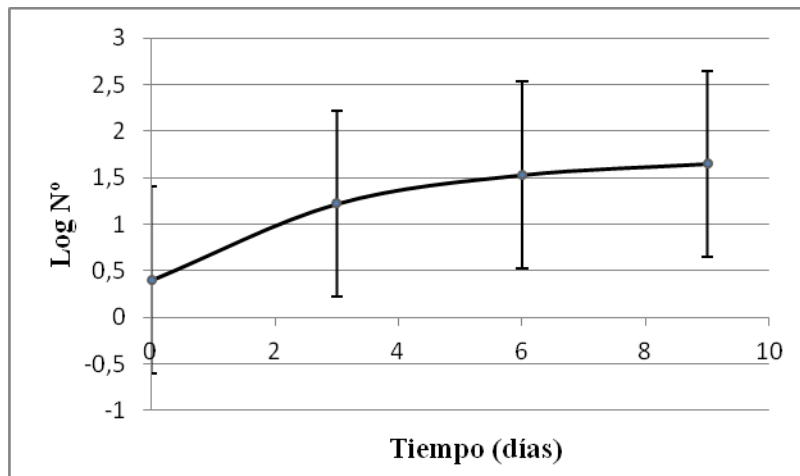


Figura 15. Curva de crecimiento de las células de testículo de ratón en donde se puede observar una fase logarítmica desde el tiempo 0, que se va atenuando aproximadamente a los 3 días de cultivo hasta comenzar a alcanzar una fase estacionaria.

Con el método del MTT se estimó la tasa de proliferación de las células de testículo de ratón determinando la variación de la densidad óptica, cuyo incremento está relacionado con el aumento de la población celular, a medida que transcurren los días de cultivo. En la figura 16 se observa un crecimiento exponencial mostrado por una fase logarítmica hasta los 5 días de cultivo aproximadamente, luego el crecimiento se va atenuando hasta alcanzar una fase estacionaria a los 7 días de cultivo aproximadamente.

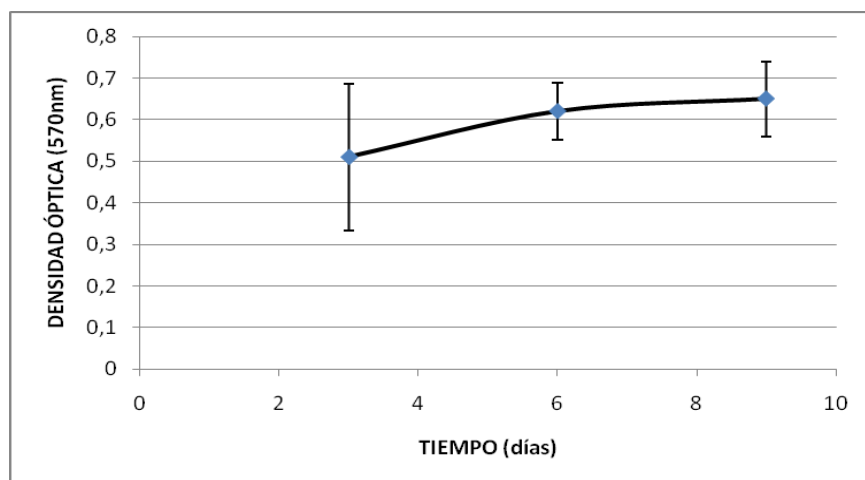


Figura 16. Curva de proliferación de células de testículo de ratón. Se observa una fase logarítmica hasta los 5 días de cultivo aproximadamente, el crecimiento se va atenuando hasta los 7 días después del cual se observa una fase estacionaria.

En ambas curvas se puede evidenciar la ausencia de una fase de latencia, esto podría deberse a que las células en cultivos utilizadas en los dos métodos provenían de cultivos primarios de células de testículo de ratón en donde estas células ya se encontraban adaptadas a las condiciones *in vitro*.

6.5 Evaluación de inducción a la diferenciación de las células germinales de testículo de ratón utilizando diferentes estrategias inductoras.

Las poblaciones de células de testículo de ratón se sembraron en dos sistemas de cultivo, en monocapa e incluidas en una matriz tridimensional de colágeno tipo I, utilizando un medio control y comparando en presencia del factor SCF.

Para evaluar la inducción a la diferenciación celular en monocapa se caracterizaron los cultivos primarios de testículo de ratón en ausencia y presencia del SCF con la coloración con Hematoxilina-Eosina e histoquímicamente con la lectina DBA y el PAS. Con la coloración Hematoxilina-Eosina se pudo determinar las morfologías presentes en el cultivo

celular, en la figura 17 se observan los cultivos primarios con el medio control y se puede evidenciar número elevado de células con características similares a las espermatogonias sobre una monocapa de células somáticas (Fig. 17-A). Cuando se realizó la histoquímica con la lectina DBA se pudo apreciar un grupo de células germinales con diferentes morfología e intensidades de marcaje lo que nos puede indicar que están en diferentes etapas del proceso de espermatogénesis, se puede observar en la figura 17-B células con morfología redondeadas similar a las espermatogonias, con una gran intensidad de marcaje con la lectina, un núcleo que ocupa gran parte de la célula; y células con una morfología alargada, donde ocurren cambios a nivel de la organización celular, con el núcleo desplazado hacia un extremo observándose una vacuola muy cercana a este similar a vesícula acrosomal, estas características pueden indicar la transformación estructural de las espermatidas que se da en la espermiogénesis. Con la determinación histoquímica con el PAS se puede observar una célula binucleada con un nucléolo prominente y gran extensión del citoplasma interactuando con células PAS-positivas de morfología redondeada con el núcleo ocupando gran parte de la célula similares a espermatogonias y con células alargadas con el núcleo desplazado hacia un extremo y hacia el otro se extiende el citoplasma similar a las espermatidas (Fig. 17-C).

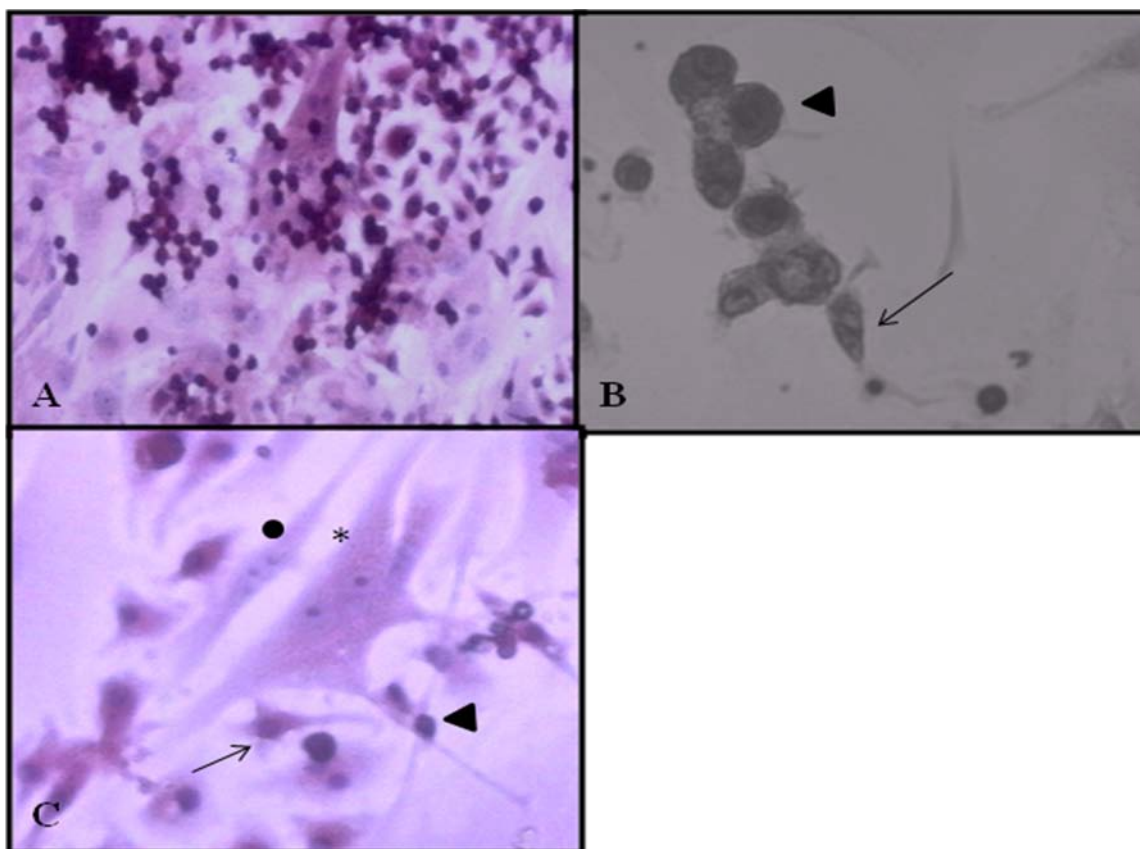


Figura 17. Cultivos primarios de 20 días de células de testículo de ratón sin factor SCF en el medio. A) Se observa una población heterogénea de células. Hematoxilina-Eosina. 200x. B) Se observan células similares a espermatogonias intensamente marcadas (►) y células con morfología alargada similares a espermatidas con menor marcaje (→), en esta célula se puede observar la presencia de una vacuola muy cercana al núcleo. Lectina DBA. 400x. C) Se puede observar una célula no reactiva al PAS, binucleada con nucléolos con gran extensión citoplasmática (*), interactuando con células PAS-positivas aparentemente células espermatogénicas en diferentes estadios del proceso de espermatogenesis (►), también se observa una célula con morfología fusiforme con características similar a las células peritubulares mioides (●) y células alargadas similar a las espermatidas en transformación estructural (→). Hematoxilina-Eosina. 400x.

La figura 18 muestra las células de testículo de ratón en cultivo con la influencia del factor SCF, en la caracterización morfológica con la coloración Hematoxilina-Eosina se puede observar una alta proporción de células con morfología redondeada y núcleo prominente basófilo, unidas mediante conexiones citoplasmáticas sobre una capa de células somáticas. Con la determinación histoquímica con la lectina se puede apreciar un grupo de

células espermatogénicas marcadas con esta proteína, estas células muestran diferentes morfologías, se puede apreciar células con un núcleo prominente y escaso citoplasma, otras con mayor cantidad de citoplasma y un menor marcaje y otras células marcadas con el núcleo desplazado hacia un extremo lo que nos indica que se encuentran en diferentes estadios de la espermatogénesis (Fig. 18-B). Algunas células con morfología redondeadas y otras con extensiones citoplasmáticas, alargadas hacia un extremo similares a células espermatogénicas PAS-positivas, se encontraron interactuando con células de mayor tamaño binucleada con gran extensión del citoplasma similar a las células de Sertoli (Fig. 18-C), de igual forma se puede observar claramente en la figura 18-D la interacción de un grupo de células espermatogénicas de diferentes morfologías PAS-positivas con la célula similar a la Sertoli no reactiva al PAS (Fig. 18-D).

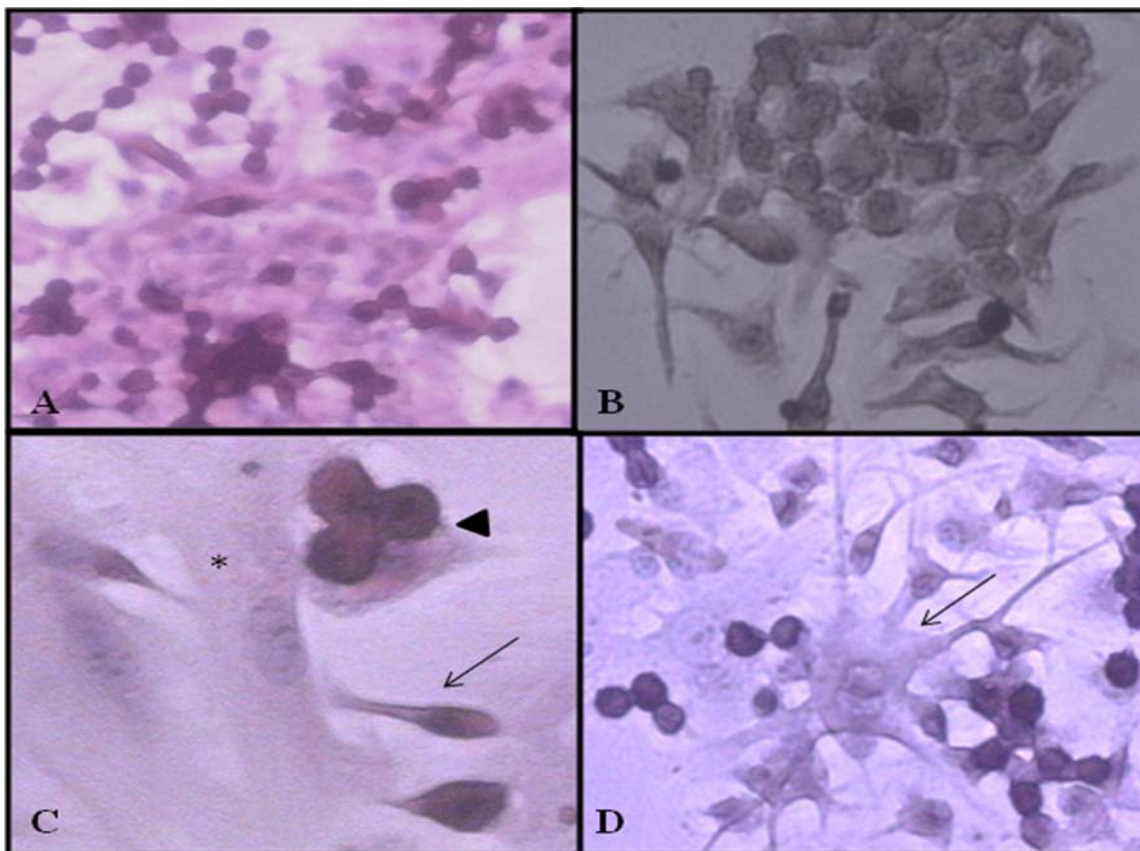


Figura 18. Cultivos primarios de 20 días de células de testículo de ratón con factor FCS en el medio. A) Se observa una población heterogénea de células. Hematoxilina-Eosina. 100x. B) Se observan células similares a espermatogonias intensamente marcadas y células con morfología alargadas similares a espermatidas con menor marcaje. Lectina DBA. 400x. C) Se puede observar una células con un núcleo central con gran extensión citoplasmática (*), interactuando con células similares a espermatogonias (◼), y con células similares a espermatidas alargadas (→). Hematoxilina-Eosina. 400x. D) Se observa una células gran extensión citoplasmática no reactiva al PAS (→) interactuando tanto con células similares a espermatogonias con PAS-positivas intensas como con células similares a espermatidas con menor intensidad de reacción al PAS. PAS. 400x.

En general en los cultivos en monocapa tanto con la influencia con el factor como con el medio control se observan los mismos tipos celulares de las células espermatogénicas en sus diferentes estadios y de las células somáticas. Sin embargo, según lo observado bajo el microscopio invertido de contraste de fases, aparentemente se

evidencia mayor proporción de células con morfología alargada similares a las espermátidas en los cultivos bajo la influencia del factor SCF.

En cuanto a la inducción a la diferenciación de las células de testículo de ratón utilizando un sustrato tridimensional de colágeno tipo I, tanto en presencia del factor SCF como en el cultivo control se observaron las diferentes morfologías que se evidenciaron en el cultivo primario en monocapa antes de la inducción. Con la ausencia del factor (Fig. 19-A) se pudo observar la composición de la matriz homogénea y células aisladas de morfología redondeada similar a las espermatogonias y células con citoplasma irregular con un núcleo basófilo incluídas en la matriz; las células similares a espermatogonias presentan un núcleo prominente basófilo y escaso citoplasma (Fig. 19-B). Además se pudo observar la interacción de una célula con grandes extensiones citoplasmáticas aparentemente una célula de Sertoli, con un grupo de células de morfología redondeada.

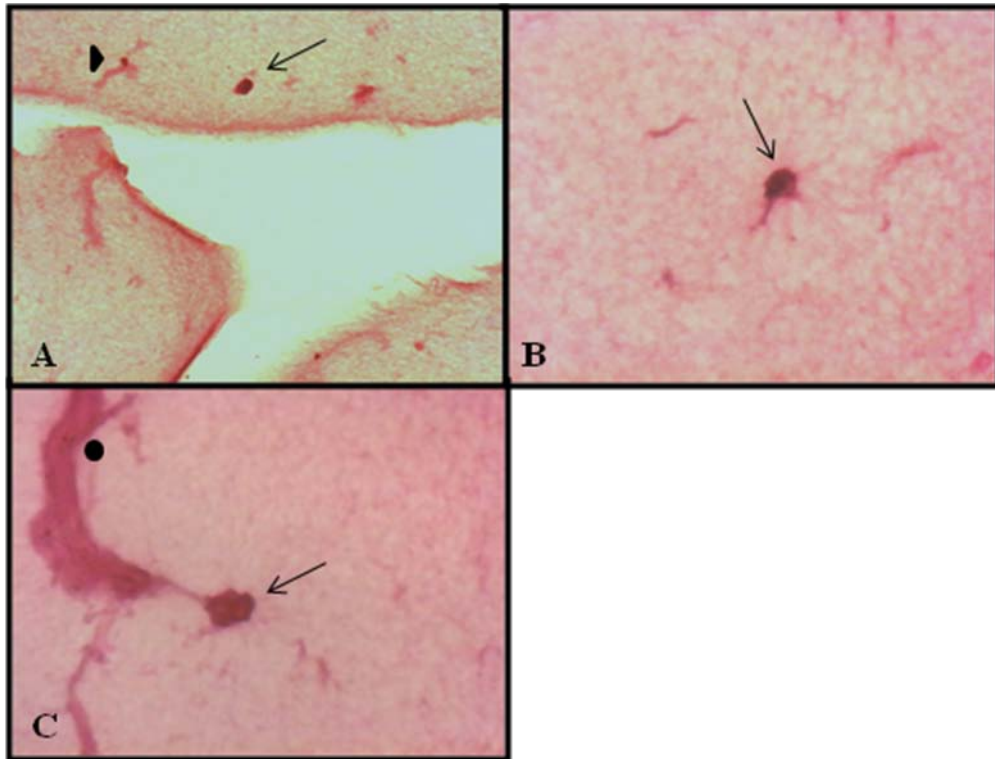


Figura 19. Células de testículo de ratón embebidas en una matriz tridimensional de colágeno tipo I. A) Vista panorámica de la matriz en donde se puede observar su composición homogénea, incluida en ella se puede apreciar células de morfología redondeada similar a las espermatogonias (→) y células con citoplasma irregular y núcleo basófilo (▴). 200x. B) Detalle de una célula similar a espermatogonia donde se evidencia la presencia de un núcleo prominente y escaso citoplasma (→). 400x. C) Se observa en detalle un grupo de células similares a espermatogonias (→) interactuando con una célula de citoplasma extendido (●). Coloración Hematoxilina-Eosina. 400x.

En la matriz de colágeno tipo I en presencia de factor se pudo observar células con las morfologías descritas anteriormente (Fig. 20), se aprecian tanto células aisladas de morfología redondeadas similares a espermatogonias como grupos de ellas (Fig. 20-A); estos grupos de células forman agregados tipo globular, presentan un escaso citoplasma y núcleo ovoide prominente intensamente basófilo (Fig- 20-B). También se encontraron células con un núcleo ovoide y un nucléolo (Fig- 20-C) además células con grandes extensiones citoplasmáticas (Fig. 20-D).

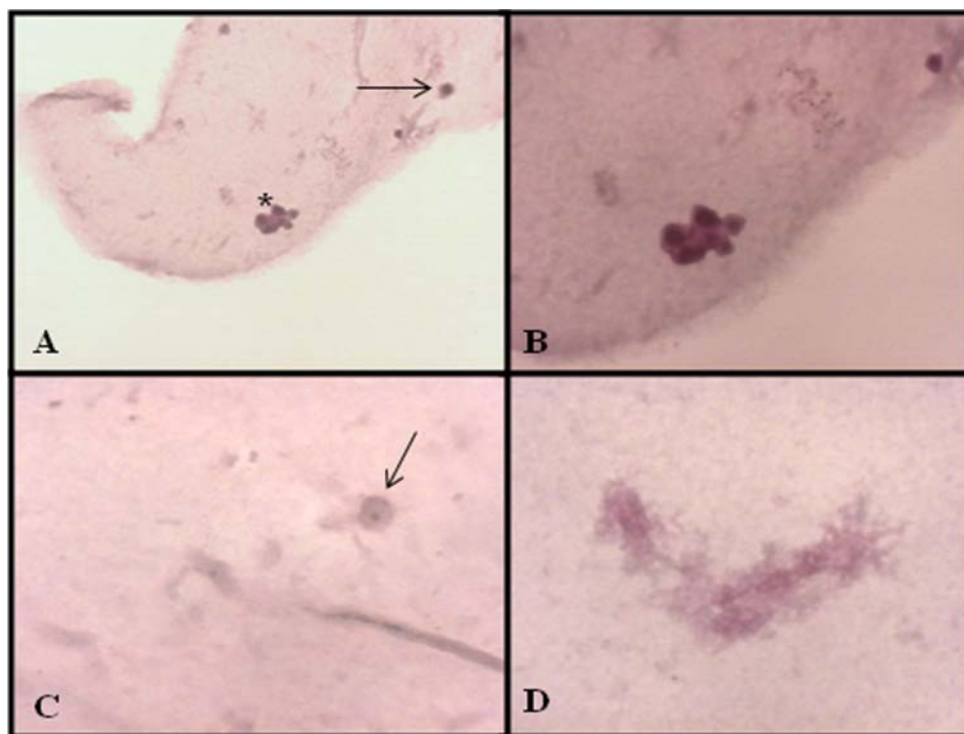


Figura 20. Células de testículo de ratón embebidas en una matriz tridimensional de colágeno tipo I en presencia del factor SCF. A) Vista panorámica de la matriz de composición homogénea en donde se puede evidenciar la presencia de células similares a espermatogonias aisladas (→) y formando agregados celulares tipo globular (*). 200x. B) Detalle de un grupo de células con escaso citoplasma y núcleo ovoide prominente intensamente basófilo formando un agregado tipo globular. 400x. C) Detalle de una célula con núcleo ovoide basófilo con un nucléolo muy marcado (→). 400x. D) Se observa un grupo de células con grandes extensiones citoplasmáticas similar a las células de Sertoli. Coloración Hematoxilina-Eosina. 400x.

En la caracterización histoquímica de la matriz control se pudo observar un grupo de células marcadas con la lectina DBA sugiriendo que se trata de células de espermatogonias, en el grupo mostrado en la Figura 21 se puede evidenciar la presencia de dos núcleo ovoides con un nucléolo, aunque las células mostraron expresión no fue posible observar sus límites celulares.

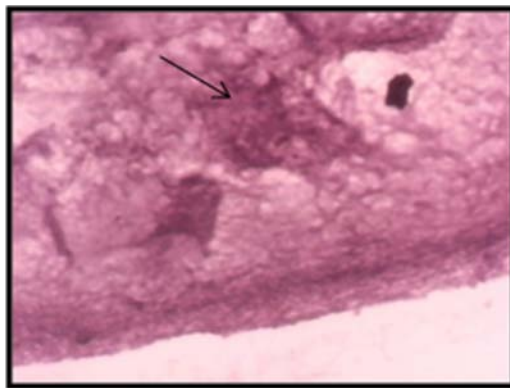


Figura 21. Caracterización histoquímica del cultivo en matriz tridimensional de colágeno tipo I de células de testículo de ratón. Se puede observar un grupo de células con expresión de la lectina evidenciándose dos núcleos ovoides con un nucléolo. Lectina DBA. 200x.

En la matriz tridimensional de colágeno tipo I de células de testículo de ratón caracterizada histoquímicamente con la lectina DBA y el PAS, se pudo evidenciar la presencia de un grupo de células con morfología redondeada similar a las espermatogonias formando un agregado celular tipo globular marcadas con la lectina DBA (Fig. 22-A), también se puede observar una célula con escaso citoplasma y un núcleo que abarca la mayor parte celular PAS-positiva, lo que sugiere que se trata de células espermatogonias (Fig. 22-B).

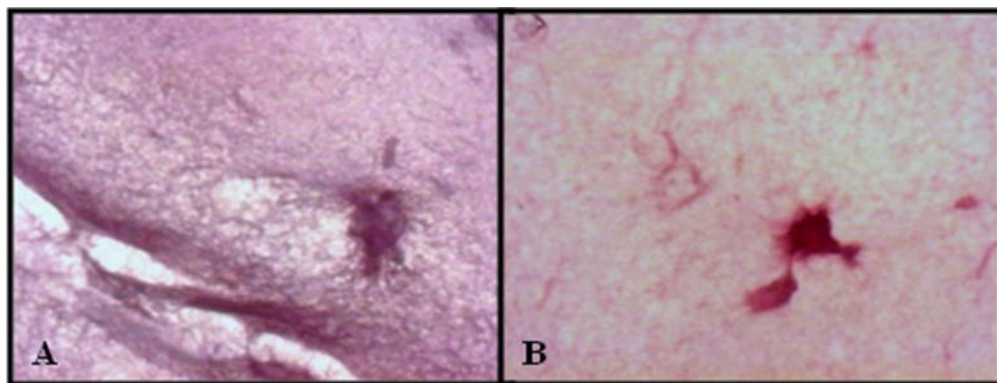


Figura 22. Caracterización histoquímica de células de testículo de ratón incluidas en una matriz tridimensional de colágeno tipo I en presencia del factor SCF. A) Se puede observar un grupo de células formando un agregado tipo globular marcado con la lectina DBA. Lectina DBA. 200x. B) Se evidencia la presencia de una célula PAS-positiva con escaso citoplasma y núcleo prominente. PAS. 400x.

En la evaluación de la diferenciación de las células espermatogénicas incluidas en la matriz tridimensional de colágeno tipo I también se pudo observar la presencia de estructuras ramificadas con presencia de lumen en su interior lo que podría indicar la diferenciación hacia otro linaje celular (Fig. 23).

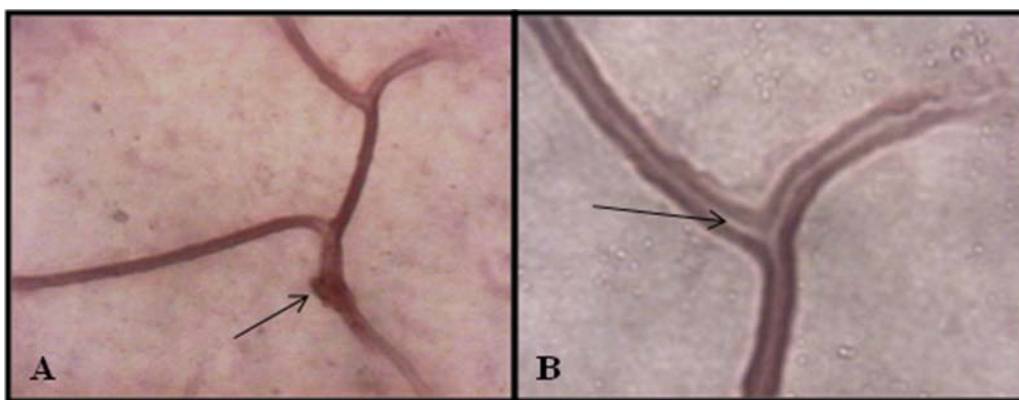


Figura 23. Estructuras encontradas en la matriz tridimensional de colágeno tipo I con la influencia del factor SCF. A) se observa una estructura con grandes ramificaciones, además se puede apreciar la presencia de un núcleo prominente (→). 200x. B) Detalle de una estructura ramificada en donde se puede apreciar el lumen en su interior. (→). 400x. Coloración Hematoxilina-Eosina.

6.6 Criopreservación celular y descongelación

Las células de testículo de ratón recién destetado fueron criopreservadas por el método convencional utilizando como crioprotector glicerina al 10% y por vitrificación. Luego de 30 días fueron descongeladas, se determinó que con el método de de vitrificación hubo un mayor porcentaje de células viables (86%) con respecto a la criopreservación con el método convencional utilizando el glicerol (68%) como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad celular después de la descongelación con glicerol al 10% y por el método de vitrificación.

Viabilidad celular Método	Porcentaje
Glicerol al 10%	68%
Vitrificación	86%

Por ambos métodos se obtuvo una alta viabilidad celular después de la descongelación por lo que se sembraron en monocapa las células para determinar si eran capaces de mantenerse en cultivo (Fig. 24). Solamente algunas células lograron adherirse a la superficie de cultivo en baja proporción de estas en relación al número de células viables obtenidas después de la descongelación con ambos métodos. No se observó diferencia relevante entre ambos métodos con respecto al número de células que se adhirieron a la superficie de cultivo.

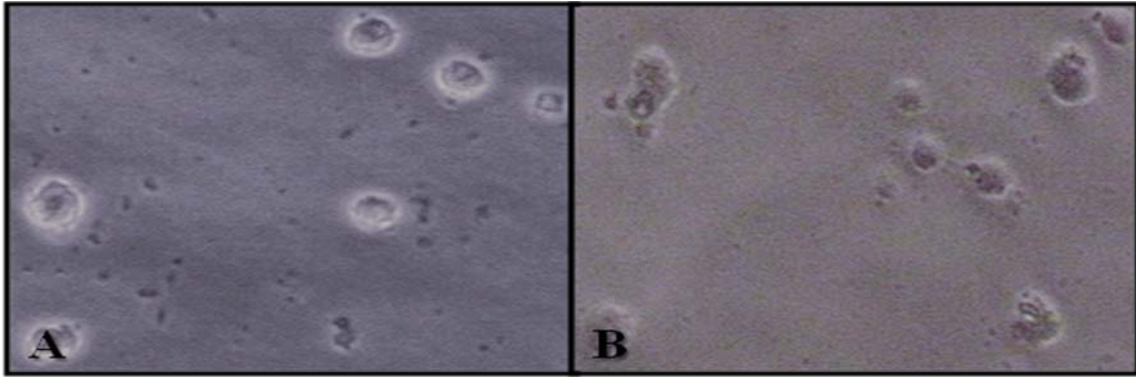


Figura 24. Cultivo celular de células después del proceso de criopreservación. En ambos casos se observan sólo algunas células con morfología redondeadas adheridas a la superficie de cultivo después de 30 días de Criopreservación. Contraste de fases. 400x.

7. 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 regenerativa y la bioingeniería tisular (Brinster y Avarbock, 1994). 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 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), en este trabajo presentamos una serie de metodologías que permiten aislar y cultivar las células testiculares, evaluando el potencial de proliferación y diferenciación de las células madre de espermatogonias, bajo diferentes microambientes y estrategias de cultivo.

En primer lugar discutiremos el establecimiento del cultivo primario de células de testículo de ratón, así como su caracterización, luego consideramos el potencial de proliferación y diferenciación de estas células *in vitro* y por último hablaremos sobre la viabilidad y adhesión de las células testiculares después del proceso de criopreservación.

7.1 Establecimiento del cultivo primario y subcultivo de las células 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.

El cultivo primario presentó una heterogeneidad celular, en donde se apreció 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.

Las células de Sertoli *in vivo*, han sido descritas como células cilíndricas con prolongaciones apicales y laterales extensas (Ross y Pawlina, 2007), en cultivo, se ha señalado que las células de Sertoli no tienen una morfología definida aunque se observan de gran tamaño con grandes extensiones citoplasmática (Izadyar y col., 2003), en nuestro trabajo también se observó esta morfología y se pudo evidenciar, además la presencia de uno o dos núcleos en estas células con grande nucléolos ovoides.

En relación a las células mioides peritubulares tienen características de células musculares, con morfología alargada tipo fusiforme con un núcleo central tanto *in vivo* como *in vitro* (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.

Por otra parte, las células de espermatogonias tipo A son conocidas como las células madre de la línea germinal masculina, las SSCs y su morfología ha sido descrita 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 diferentes 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, 2010).

En cuanto a los espermatoцитos se describen como células redondeadas con el núcleo ovoide prominente con un patrón distintivo de cromatina, el citoplasma en mayor proporción que el de las SSCs (Roos y Pawlina, 2007) y su tamaño es menor que estas últimas (Bellvé y col., 1977). La morfología descrita concuerda con células encontradas en los cultivos en monocapa establecidos en este trabajo, las diferencias morfológicas observadas entre los espermatoцитos y las espermatogonias se basan principalmente en la proporción núcleo-citoplasma, en los primeros la proporción del citoplasma es mucho mayor y el núcleo se observa condensado y de menor tamaño con respecto al de las espermatogonias.

Los tipos celulares de la línea espermatogénica encontrados en este trabajo como se ha mencionado fueron las SSCs y los espermatoцитos, 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 espermátocitos (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 diferenciación de las SSCs *in vitro*, ya que uno de nuestros objetivos es la diferenciación de este tipo celular hacia su propio linaje.

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).

Al formar las colonias las SSCs se conectan a través de puentes citoplasmáticos constituyendo un sincitio, pudiéndose comunicarse 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).

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. La interacción entre las células de Sertoli y las SSCs, y los factores de crecimiento y citoquinas secretadas por las células somáticas en la monocapa influyen en la

supervivencia de las SSCs y proporciona un microambiente para la proliferación y formación de colonias.

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. 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). 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 lamina 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.

Las células de testículo de ratón presentes en el cultivo primario en monocapa lograron subcultivarse por lo menos una vez manteniendo sus características morfológicas y su comportamiento *in vitro*. Aunque se observaron las mismas morfologías las células somáticas se encontraron en menor proporción que en los cultivos primarios; de la misma forma que en los cultivos primarios las células espermatoogénicas se agruparon formando los dos tipos de colonias descritos anteriormente sobre la monocapa formada por las células de Sertoli principalmente. Algunos autores han logrado establecer sucesivos subcultivos con el uso de la combinación de Tripsina-EDTA, hasta más de 11 subcultivos (Izadyar y col., 2003).

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 autorenovación, proliferación y su potencial de diferenciación de las SSCs lo cual resulta importante en la inducción de la expresión de un fenotipo.

7.2 Características histológicas e inmunohistoquímicas de los cultivos primarios y subcultivos de células de testículo de ratón.

Los estudios morfológicos de las células se realizaron a través de coloraciones de rutina Hematoxilina-Eosina y MayGrunwald-Giemsa. Las SSCs se tiñeron 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 MayGrunwald-Giemsa, estas características histológicas ha 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 espermátidas. En general estos cultivos mostraron diferentes morfologías pudiéndose apreciar una monocapa confluyente de células somáticas y células espermátogénicas en diferentes estadios, esta descripción concuerda con la reportada por Izadyar y col. (2003).

Algunos investigadores han reportado el uso de determinaciones histoquímicas como el PAS y la Lectina DBA para caracterizar las células del linaje espermátogénico, 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 espermátogénico.

El mayor interés en este trabajo son las SSCs cuya morfología ha sido descrita anteriormente, estas células son reactivas al PAS del mismo modo se pueden marcar con la lectina DBA. Con ambos marcadores se pudo observar diferentes intensidades de reacción en el caso del PAS y de marcaje con la lectina. Las SSCs contienen glucógeno en el citoplasma lo que las hace reactivas al PAS (Chang y col., 2001), en los resultados obtenidos se pudo corroborar la presencia de las células espermatogénicas ya que todas las células con características de células del linaje germinal reaccionaron positivamente al PAS, en diferentes intensidades de reacción, las células espermatogénicas menos diferenciadas tuvieron una reacción fuerte mientras que la mas diferenciadas como los espermatocitos mostraron una reacción más leve, esto hace suponer que la cantidad de glucógeno en las SSCs indiferenciadas es mayor.

En el caso de la lectina DBA la diferencia de marcaje se hizo más evidente, en donde se puede observar que células SSCs con morfología redondeada núcleo ovoide prominente con nucléolo y escaso citoplasma se marcaron intensamente con la Lectina, otras células con morfología similar, los espermatocitos, se mostraron con mayor cantidad de citoplasma se marcaron en menor intensidad. En estos cultivos de 18 días se observaron las células descritas anteriormente, aparentemente espermátidas, que con la Lectina mostraron un núcleo ovoide desplazado hacia un extremo de la célula y el citoplasma con una extensión en el extremo opuesto al núcleo, estas observaciones ha sido reportadas por otros investigadores que han utilizado esta proteína para caracterizar los diferentes estadios de las células espermatogénicas (Izadyar y col., 2003).

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.

Cabe destacar que las células de Sertoli son negativas a la reacción del PAS de la misma forma que no se marcaron con la histoquímica de Lectina, mientras que las células similares a mioides peritubulares presentan una leve reacción al PAS debido a sus características de células musculares, estas células presentaron una morfología alargada tipo fusiforme con el núcleo ovoide central y nucléolo.

Las células de Sertoli con largas extensiones citoplasmáticas PAS-negativas presentan un gran núcleo con varios nucléolos, estas células mantienen conexiones con las células espermatogénicas positivas al PAS presentando una coloración rojiza.

En ambas determinaciones histoquímicas se pone en evidencia el mantenimiento de las células espermatogénicas y el cambio de la composición de la población celular, conformada en un principio por abundantes SSCs y espermatocitos, luego con el transcurso del tiempo de cultivo se apreció cambios morfológicos en las células del linaje espermatogénico, observándose la presencia de espermátidas con la morfología descrita previamente. Además se pudo apreciar las conexiones citoplasmáticas entre las células germinales con las células de Sertoli lo que permite afirmar lo anteriormente expuesto sobre los factores secretados estas células que contribuyen al mantenimiento y proliferación de este linaje en cultivo.

Con respecto a la caracterización inmunocitoquímica, las células de Sertoli mostraron expresión a la vimentina; esta molécula es una proteína del citoesqueleto que por lo general

se encuentra en el epitelio de las células, en las células de Sertoli está estrictamente localizada en la región perinuclear (Koruji y col., 2007), según Johnson y col. (1987) la célula de Sertoli y su citoesqueleto permiten la organización del tejido seminífero mediante la organización de microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos, lo que facilita la estructuración de las uniones entre las células de Sertoli con las células germinales, con la lámina basal así como con ellas mismas. Con esta caracterización se evidenció la presencia de las células de Sertoli en los cultivos, así como la interacción de ellas con grupos de SSCs.

La expresión de la vimentina es típica en este tipo de células debido a su origen mesodérmico como lo han reportado Rodríguez y col. (2004) y De Rooij y Mizrak (2008). Además se ha demostrado que la vimentina se encuentra unida al núcleo, al retículo endoplasmático y a mitocondrias, por lo que se piensa presenta un papel importante en el soporte y anclaje de las organelas en el citoplasma, organización del citoesqueleto, integridad del citoplasma y morfología celular (Goldman y col., 1996). Así mismo, existen reportes que adjudican a la vimentina funciones relacionadas al transporte de lipoproteínas de baja densidad derivadas del colesterol, desde los lisosomas hacia su sitio de esterificación (Sarria y col., 1992).

Existen marcadores que algunos autores sugieren que son específicos para las células mioideas peritubulares como la actina del músculo liso (van Pelt y col., 2002), con el uso de este marcador se podría asegurar la presencia de estas células en el cultivo primario de testículo de ratón.

7.3 Cinética de las células en cultivo.

La tendencia de la curva de crecimiento celular muestra un crecimiento exponencial en los primeros 3 días de cultivo y a medida que va transcurriendo el tiempo se observa un crecimiento celular más lento hasta alcanzar el comienzo de una fase estacionaria a los 6 días de cultivo. Mientras que el ensayo de proliferación celular de las células de testículo demostró que el crecimiento exponencial comienza antes del tercer día de cultivo y dura hasta el 5to día aproximadamente luego se va atenuando hasta alcanzar el comienzo de la fase estacionaria a los 7 días.

Otros ensayos de proliferación mostrados por He y col. (2010) muestran una fase de latencia los 2 primeros días de cultivo, esto concuerda con nuestros resultados por el método del MTT en donde probablemente se apreciaría esta fase entre el primer y el segundo día de establecido el cultivo.

En la curva de crecimiento no se observa una fase de latencia típica en todas las curvas de este tipo, esto se puede deber a que las células en crecimiento provenían de un cultivo primario previamente establecido en donde las células ya se encontraban adaptadas a las condiciones *in vitro* suministradas.

En general la tendencia de las dos curvas es similar, las células testiculares en cultivo tienen rápida proliferación en donde la división celular se lleva a cabo con éxito, alcanzando una confluencia los primeros días de cultivo, esto se pudo evidenciar con la observación bajo el microscopio invertido de contraste de fases a medida que pasaron los días de cultivo, sin embargo el cultivo de este tipo celular puede mantenerse confluyente y llegar a una fase estacionaria por la limitación de recursos existente en él, en donde las

células dejan de dividirse. Por otra parte Kubota y col. (2004) reportaron que la adición de GDNF exógeno produce un aumento considerable en la duración de la fase exponencial de las SSCs en cultivo.

7.4 Inducción y caracterización de la diferenciación de las células de testículo de ratón hacia su propio linaje.

Con el fin de analizar el potencial de diferenciación de las células germinales de testículo de ratón *in vitro* se ensayo la acción del factor SCF y de dos sistemas de cultivos: en uno bidimensional en monocapa y en una matriz tridimensional de colágeno tipo I.

El sistema bidimensional en monocapa consiste en sembrar las células en un sustrato plano en donde se adhieren formando una monocapa, estos cultivos fueron mantenidos suplementando el medio nutritivo con el factor SCF tomando como control cultivos sin la adición del factor. Ambos cultivos mostraron características similares, en donde se observó la presencia de las mismas morfologías descritas anteriormente, tanto del linaje espermatogénico como de las células somáticas corroborando los fenotipos espermatogénicos con la histoquímica de Lectina y el PAS. En los cultivos en el sistema en monocapa se llevo a cabo el proceso de diferenciación de las células SSCs hacia espermátidas, 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 a el 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 espermiogenesis (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 tubo. En los cultivos bajo la influencia del factor SCF aparentemente según lo observado bajo el microscopio de contraste de fases, se evidenció la presencia de una mayor proporción de espermatidas que en el cultivo control, lo que sugiere que este factor contribuye en la diferenciación de las SSCs.

La diferenciación espontánea observada en el cultivo control 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).

Además de esto se encuentran en el cultivo una monocapa confluyente de células de somáticas principalmente de Sertoli que como fue explicado anteriormente segrega el factor GDNF. El complejo receptor de factor GDNF está integrado por la tirosina quinasa del receptor RET y un co-receptor glicofosfatidilinositol (GPI) y se expresa en las espermatogonias indiferenciadas; si el nivel de expresión GDNF es bajo el número de espermatogonias indiferenciadas se reduce, en contraste si el nivel es alto se activa la diferenciación de las espermatogonias (Yomogida y col., 2003), lo que se podría explicar con la alta tasa de proliferación que tienen estas células los primeros días de cultivo, algunos autores han reportado que las SSCs duplican su número cada 5,3 días (He y col., 2010), mientras que las células de Sertoli muestran una menor tasa de proliferación llegando al duplicar su número cada 7 días (Schlatt y col., 1996). Por otra parte también se ha demostrado que el factor SCF es secretado por las células de Sertoli tanto *in vivo* como *in vitro* pero en niveles mucho menores en cultivo (Yan y col., 2000), lo que podría influir en la diferenciación en el cultivo control.

Por otra parte la inducción de la diferenciación en el sistema de cultivo tridimensional, consistió en incluir las células de testículo de ratón en una matriz de colágeno tipo I, que le proporciona a las células un microambiente similar a su nicho *in vivo*. Del mismo modo que

en la inducción en el sistema bidimensional se evaluó la influencia del factor SCF en la diferenciación de las SSCs en cultivo tomando como control cultivos sin la influencia del factor. En ambas matrices de colágeno tipo I se observó la composición homogénea de la matriz, con la presencia de células con características de la línea espermatogénica aisladas y formando agregados celulares tipo globular, también se logró observar la presencia de algunas células somáticas con extensiones citoplasmáticas interactuando con estos grupos celulares que se marcaron con la histoquímica de Lectina y reaccionaron positivamente al PAS corroborando de esta forma su linaje espermatogénico.

En la matriz control no se logró apreciar la diferenciación de las SSCs a pesar de evidenciarse las interacciones celulares, lo mismo ocurrió en las matrices bajo la influencia del factor SCF. Cabe destacar la presencia de núcleos picnóticos, según lo observado bajo el microscopio de contraste de fases, lo que puede indicar senescencia celular, en tal sentido se observó una baja densidad celular a los 15 días de cultivo con respecto a la densidad inicial de las células embebida en cada matriz, lo que sugiere que tanto las SSCs como las células somáticas no se logran mantener viables bajo estas condiciones. Si hay una baja densidad de células somáticas hay una baja interacción entre estas y las SSCs, y la influencia de los factores segregados por las células somáticas, que pueden afectar de manera negativa en la proliferación de este tipo celular. Otro factor importante en el desarrollo de la diferenciación en este tipo de sistema que debe tomarse en cuenta es la temperatura del sistema, algunos autores indican que una temperatura menor a la utilizada en nuestro trabajo, específicamente una temperatura de 34°C podría mejorar las condiciones de las células en el cultivo (Hamano y col., 2007; Sato y col., 2011).

En tal sentido Elhija y col. (2011) lograron inducir la diferenciación de las SSCs utilizando una matriz de agar soportado por una capa de células somáticas, el cultivo consistió en dos capas, una inferior sólida compuesta por agar al 0,5% en donde fueron incluidas las células somáticas y una capa superior suave también constituida por agar pero al 0.37% en donde se encontraban las SSCs, de esta forma los factores secretados por las células de Sertoli pudieron inducir la diferenciación hacia el linaje espermatogénico. Por otro parte, Sato y col. (2011) lograron producir espermatozoides maduros en un sistema tridimensional incluyendo las células testiculares en un gel de agarosa con medio RPMI libre de suero, suplementado con una proteína denominada KSR. Los dos sistemas mencionados muestran grandes diferencias con el utilizado por nosotros, en ambos se encuentran diferentes factores que influyen en el proceso de espermatogénesis *in vitro*. Para mejorar nuestro sistema es preciso sembrar una monocapa de células de Sertoli que apoyen la diferenciación de las SSCs incluidas en la matriz tridimensional, a través de la secreción de factores como GDNF y SCF, además de la adición exógena de este factor.

En cuanto al factor se ha demostrado que juega un papel importante en la adhesión de las células espermatogénicas a las células somáticas, probablemente en sinergismo con otras moléculas (Pesce y col., 1997), del mismo modo el factor SCF de adhesión es crucial para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células germinales (Tu y col., 2007). La presencia de factor en la matriz de colágeno no fue suficiente para que se llevara a cabo el proceso de diferenciación de las SSCs, la ausencia de las condiciones expuestas anteriormente influyeron de manera negativa en el proceso de diferenciación.

Por otra parte Kanatsu-Shinohara y col. (2004) lograron generar células madre pluripotentes a partir de células madre de testículo de ratón, reportando que bajo ciertas

condiciones *in vitro*, las SSCs se comportan de manera similar a las células madre embrionarias (ESC), logrando la formación de típicas colonias de las ESC y de cuerpos embrioides. Recientemente se ha demostrado que las ESC derivadas de testículo humano no son pluripotentes sino que tienen similitud a las células madre mesenquimales (MSC) en relación a su potencial de diferenciación (Chikhouskaya y col., 2012).

Considerando lo señalado en nuestro trabajo se evidenció una aparente diferenciación de las SSCs a un linaje diferente al espermatogénico. En la matriz de colágeno tipo I bajo la influencia del factor SCF se apreció la presencia de estructuras ramificadas en las que en algunas zonas se podía apreciar algunos núcleos, lo que podría indicar la diferenciación hacia otro linaje celular. En tal sentido en estudios anteriores se ha logrado la diferenciación hacia un linaje vascular (Kanatsu-Shinohara y col., 2004), las estructuras reportadas en esta investigación se asemejan a las encontradas en el presente trabajo. Más recientemente Im y col. (2011) lograron diferenciar las SSCs hacia células endoteliales vasculares (ECs) así como hacia células musculares lisas vasculares (VSMCs).

La explicación de esta diferencia podría deberse a la poca densidad de células de Sertoli en la matriz; en el microambiente *in vivo*, la interacción de las células de Sertoli que normalmente dirige a las SSCs al proceso de espermatogenesis, inhibe la diferenciación de estas células hacia otros linajes, sin embargo cuando la proliferación de las células del linaje germinal es continuamente estimulada en ausencia de las células de Sertoli, las células germinales son liberadas de esta inhibición y alguna de ellas son capaces de convertirse en células con mayor potencialidad a su linaje, esto se debe a la capacidad denominada plasticidad, que tienen las células madre para generar grupos celulares diferentes a los de su tejido de origen (Merentes, 2009).

7.5 Criopreservación

Una alternativa, y probablemente el mejor método para preservar las SSCs a largo plazo es la criopreservación. Investigadores afirman la importancia de esta metodología ya que podría significar un procedimiento válido para la preservación de las SSCs y de las células somáticas, con el propósito de la utilización de estas células inmaduras en futuros tratamientos de infertilidad (Izadyar y col., 2002; Milazzo y Col., 2008). La finalidad de la criopreservación es mantener la viabilidad y funcionalidad de las células a bajas temperaturas, con lo que se disminuyen las funciones vitales de las células y de esta forma mantenerlas por un tiempo prolongado.

Las células de testículo de ratón criopreservadas mantuvieron alta viabilidad después del proceso. Por ambos métodos, tanto de vitrificación como por el método convencional utilizando glicerina al 10% como agente crioprotector, se encontró un alto porcentaje de la viabilidad, 86 y 68% respectivamente, estos métodos mostraron alta eficiencia en cuanto a la viabilidad celular, a pesar de la poca adherencia resultante al cultivar las células. Pocas células lograron adherirse al sustrato del cultivo luego del proceso de criopreservación, en baja proporción con respecto al alto porcentaje de células viables obtenido. Las células que lograron la adhesión mostraron una morfología redondeada con un núcleo prominente con nucléolo y escaso citoplasma, características similares a las SSCs, no se logró observar la presencia de una monocapa de células somáticas en los cultivos, posiblemente estas células se vieron afectadas por los métodos de criopreservación, específicamente las células de Sertoli (Koruji y col., 2007); esta ausencia de células somáticas pudo afectar la adhesión de las SSCs en el cultivo.

8. CONCLUSIONES

- En el establecimiento del cultivo de células de testículo de ratón recién destetado es evidente una población celular heterogénea, dependiente de las características intrínsecas de este tejido. Esta heterogeneidad se mantiene cuando se realizan subcultivos celulares.
- El cultivo primario de células de testículo de ratón recién destetado de aproximadamente 20 días de nacidos, está constituido principalmente por células de Sertoli, células similares a mioides peritubulares, espermatogonias y espermatocitos; y carecen de células espermatogénicas más diferenciadas como espermatidas y espermatozoides, lo que ofrece una ventaja para evaluar la diferenciación hacia el linaje espermatogénico.
- Se logró establecer las condiciones de cultivo óptimas que estimulan el crecimiento celular de las SSCs indiferenciadas. Los factores presentes en el medio nutritivo, presentan un efecto estimulador de la proliferación de las células de testículo de ratón.
- Con las determinaciones histoquímicas, de Lectina DBA y el PAS, se logra evidenciar la presencia de diversas células germinales en diferentes estadios de la espermatogenesis de acuerdo a la intensidad de marcaje o de reacción según sea el caso.

- La presencia de las células de Sertoli, formando una monocapa en el cultivo es crucial para el mantenimiento de las SSCs *in vitro*, debido a la influencia de los diversos factores segregados por ella que estimula la proliferación celular.
- La densidad de las células de Sertoli podría determinar el destino de las SSCs en el cultivo en monocapa.
- La diferenciación espontánea de las SSCs se podría deber a la influencia de los diferentes componentes del SFB, así como a la presencia de las células somáticas que pueden segregar el factor GDNF segregado por las células de Sertoli. De la misma forma la adición exógena del factor SCF en el cultivo influye de manera positiva la diferenciación de las SSCs hacia espermátidas.
- La baja densidad de las células de Sertoli en el sustrato tridimensional y la presencia del factor SCF proporciona una buena condición para que algunas SSCs aparentemente se conviertan en células con mayor potencialidad y sean capaces de generar células de otro linaje diferente al de su tejido de origen.
- Es posible conseguir un alto porcentaje de viabilidad de las células criopreservadas, aunque sería necesario sembrar las SSCs obtenidas después del proceso de criopreservación sobre una monocapa de células de Sertoli para que se pueda llevar a cabo el proceso de adhesión de las células germinales, debido a que aparentemente las células somáticas se ven afectadas en algún punto del proceso de criopreservación.

9. RECOMENDACIONES

- Caracterizar las células similares a las mioides peritubulares con marcadores específicos como la actina del músculo liso.
- Caracterizar los cultivos a nivel ultraestructural, para definir las características de los organelos celulares que permitan identificar con precisión los diferentes estadios de la espermatogenesis *in vitro*.
- Determinar la actividad de la fosfatasa alcalina en los cultivos de SSCs antes y después de inducir la diferenciación celular hacia el linaje espermatogénico para evaluar el proceso.
- Ensayar la diferenciación celular de las SSCs utilizando un sistema de co-cultivo con células de Sertoli, así como en matriz tridimensional de colágeno tipo I adicionando una capa de células somáticas.
- Ensayar la diferenciación de las SSCs en el cultivo en monocapa aumentando la concentración del factor SCF y eliminando la monocapa de células somáticas.
- Caracterizar inmunocitoquímicamente las estructuras ramificadas encontradas en la matriz tridimensional para determinar su fenotipo celular.
- Realizar un ensayo de trasplante de SSCs en cultivo, a ratones estériles receptores para estudiar la posibilidad de la regeneración de la espermatogénesis, e incluso luego de la diferenciación de estas hacia espermátidas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, J., Watt, F. 1993. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Developmental*. **117**: 1183-1198.
2. Aguilar, J., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ortiz, A., González, E., Ortiz, J., Peralta, L. y colaboradores. 2004. Células madre espermatogonias. *Rev. Int. Androl*. **2**:54-59.
3. Anderson, D., Gage, F., Weissman I. 2001. Can stem cells cross lineage boundaries?. *Nat. Med*. **7**: 393-395.
4. Araos, C. 2008. Cultivo de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano. Potencialidad ósteo-condrogénica *in vitro*. Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
5. Arias, M. E., Felmer, R. 2009. Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. *Arch. Med. Vet*. **41**: 185-195.
6. Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. y colaboradores. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol*. **57**: 291-300.
7. Bellvé, A., Cavicchia, J., Millette, C., O'Brien, D., Bhatnagar, Y., Dym, M. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. *J. Cell. Biol*. **74**: 68-85.
8. Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Robey, P. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. **19**: 180-92.
9. Brinster, R., Avarbock, M. 1994. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **91**: 11303-11307.

10. Brinster, R., Zimmermann, J. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 11298-11302.
11. Bosch, J., Lopez-Picazo J. M., González, L., García-Foncillas López, J., Prósper Cardoso F. 2007. Células madre y cáncer: dilucidando el origen de la célula madre tumoral. *Rev. Med. Univ. Navarra.* **51**:14-17.
12. Botella, J.; Fernandez, A. 1998. La evolución de la sexualidad y los estados intersexuales. Fundación Gregorio Marañón. Madrid- España.
13. Caires, K., Broady, J., McLean, D. 2010. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol.* **205**:133-145.
14. Carlin, R.; Davis, D.; Weiss, M.; Schultz, B. y Troyer, D. 2006. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod. Biol. Endocrin.* **4**: 8-21.
15. Carlson, B. 2009. Embriología humana y biología del desarrollo. 4ta edición. Editorial Elsevier España S.L. Madrid, España.
16. Cediell, J., Cárdenas, M., García, A., Chuairé, L., Payá, C., Villegas, V., Sánchez, C. 2009. Manual de histología. Tejidos fundamentales. 1era edición. Editorial Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia.
17. Chang, Y., Lee, J., Panneerdoss, S., MacLean, J., Rao, M. 2001. Isolation of Sertoli, Leydig, and spermatogenic cells from the mouse testis. *BioTechniques.* **51**: 341-344.
18. Chikhovskaya, J., Jonker, M., Meissner, A., Breit, T., Repping, S., van Pelt, A. 2012. Human testis-derived embryonic stem cell-like cells are not pluripotent, but possess potential of mesenchymal progenitors. *Hum. Reprod.* **27**: 210-221.

19. De Rooij, D., Mizrak, S. 2008. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development*. **135**: 2207-2213.
20. Deuel, T. 1987. Polypeptide growth factors: roles in normal and abnormal cell growth. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **3**: 443.
21. Eynard, A., Vlentich, M.; Rovasio, R. 2008. Histología y embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares. 4ta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
22. Flores G., Paniagua, J. 2006. Las células madre embrionarias totipotenciales. *Gaceta Biomédicas*. **11**:13-14.
23. Freshney, I. 2000. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 4ta edición. Wiley-Liss, E. U. A.
24. Gilbert, S. 2006. Biología del desarrollo. 7ma edición. Editorial Médica Panamericana. Caracas, Venezuela.
25. Goldman, R., Khuon, S., Chou, Y., Opal, P., Steinert, P. 1996. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell Biol.* **81**: 40-50
26. Gómez de F., Campos, A. 2008. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. Editorial Médica Panamericana. Tercera edición. Madrid-España.
27. Guzmán, L. 2005. Colonización intraluminal de los túbulos seminíferos de ratones post-trasplante intraespecífico de las células germinales primordiales. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
28. Hamano, K.; Sugimoto, R.; Takahashi, H. y Tsujii, H. 2007. Spermatogenesis in immature mammals. *Reprod. Med. Biol.* **6**: 139-149.

29. He, Z., Kokkinaki, M., Jiang, J., Dobrinski, I., Dym, M. 2010. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol. Reprod.* **82**:363-372.
30. Herrero, L. 2004. Procedimientos en virología médica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
31. Izadyar, F., Matthijs-Rijsenbilt, J., Den Ouden, K., Creemers, L., Woelders, H., De Rooij, D. 2002. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J. Andro.* **23**: 537-545.
32. Izadyar, F., Den Ouden, K., Creemers, L., Posthuma, G., Parvimen, M., de Rooij, D. 2003. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol. Reprod.* **68**: 272-281.
33. Johnson, L., Nguyen, H., Petty, C., Neaves, W. 1987. Quantification of human spermatogonogenesis: germ cell degeneration during spermatocytogenesis and meiosis in testes from younger and older adult men. *Biol. Reprod.* **37**: 739-747.
34. Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., Shinohara, T. 2003. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* **69**: 612-616.
35. Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S. y colaboradores. 2004. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell.* **119**: 1001-1012.
36. Kierszenbaum, A. 2008. Histología y biología celular: introducción a la anatomía patológica. Editorial Elsevier Mosby. Segunda edición. Barcelona-España.
37. Koruji, M., Movahedin, M., Javad, S., Gourabi, H. 2007. Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. *Iranian J. Reprod. Medicine.* **5**: 109-115.

38. Kossack, N., Meneses, J., Shefi, S., Nam, H., Chavez, S., Nicholas, C., Gromoll, J. y colaboradores. 2009. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells*. **27**: 138-149.
39. Kubota, H., Avarbock, M., Brinster, R. 2004. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *PNAS*. **47**: 16489-16494.
40. Kubota, H., Brinster, R. 2006. Technology insight: *in vitro* culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat. Rev. End.* **2**: 99-107.
41. Lassalle, B.; Ziyat, A.; Testart, J.; Finaz, C., Lefèvre, A. 1999. Flow cytometric method to isolate round spermatids from mouse testis. *Human Reprod.***14**: 388-394.
42. Lechner, V. 2007. Stem cells: proyecciones en ingeniería de tejidos. *Rev. Ped. Elec.* **4**:17-21.
43. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Ziposky, L. y colaboradores. 2005. Biología celular y molecular. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana. Caracas, Venezuela.
44. Matorras, R., Hernández, J., Molero, D. 2008. Tratado de reproducción humana para enfermería. Editorial Médica Panamericana. Madrid-España.
45. Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M., Parvinen, M., de Rooij, D., Hess, M., Raatikainen, A. y colaboradores. 2000. Regulation of cell fate decisión of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*. **287**: 1489-1493.
46. Merentes, E. 2009. Fuentes de obtención de células madre mesenquimales potencialidad de diferenciación *in vitro*. Trabajo para optar a la categoría de profesor titular. Universidad Central de Venezuela.

47. Milazzo, J., Vaudreuil, L., Cauliez, B., Gruel, E., Massé, L., Mousset-Siméon, N. Macé, B. y colaboradores. 2008. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum. Reprod.* **23**:17-28.
48. Mosman, T. 1983. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
49. Moon, J., Lee, J., Jee, B., Suh, C., Kim, S., Lim, H., Kim, H. 2008. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum. Reprod.* **23**: 1760-1770.
50. 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.
51. Nagano, M., Ryu, B., Brinster, C., Avarbock, M., Brinster, R. 2003. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*. *Biol. Reprod.* **68**: 2207-2214.
52. Nagano, M. 2010. Techniques of Spermatogonial Stem Cell Culture Continue to Improve. *Biol. Reprod.* **84**: 5-6.
53. Nagano, M. 2011. Techniques for culturing spermatogonial stem cells continue to improve. *Biol. Reprod.* **84**: 5-6.
54. Palma, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agrícola. Primera edición. Machala, Ecuador
55. Pastor, T., Moratalla, L., Bermell, L., Beamud, M., Osca, M., Gil, M. 2010. Células madre y medicina regenerativa en urología 1.a parte: generalidades, riñón, testículo e incontinencia. Editorial Elsevier Doyma. *Actas Urol. Esp.* **34** (6): 510-515.

56. Pesce, M., Di Carlo, A., De Felici, M. 1997. The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture. *Mech. Dev.* **68**: 37-44.
57. Rodriguez, H., Ríos, A.; Sabaria, L. Ossadón, E., Araya, J. 2004. Inmunohistoquímica de filamentos intermedios, tipo vimentina y desmina, y enzima enolasa en túbulos seminíferos seniles humanos. *Rev. Int. Androl.* **2**: 9-19.
58. Rodriguez, V. 2005. Células madre: conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas Scientiarum.* **10**:5-14.
59. Ross, M., Pawlina, I. 2007. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
60. Rugeles, M., Patiño, P., Montolla, C. 2009. Inmunología. Una ciencia activa. 2da Edición. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
61. Sarria, A., Panini, S., Evans, R. 1992. A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 220-229.
62. Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubata, Y. y colaboradores. 2011. In vitro production of functional sperm in culture neonatal mouse testes. *Nature.* **471**: 504-508.
63. Schlatt, S., Kretser, D., Loveland, K. 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.
64. Sharp, J. 1980. Introducción al cultivo de tejidos animales. 2da edición. Editorial Omega. Barcelona, España.

65. Tu, J., Fan, L., Tao, K., Zhu, W., Li, J., Lu, G. 2007. Stem cell factor affects fate determination of human gonocytes *in vitro*. *Reproduction*. **134**: 757-765.
66. Urbaneja, M., Gugig, M., Bello, R. 1975. Cultivo de tejidos animales. Trabajos de laboratorios. Edición U.C.V. Caracas, Venezuela.
67. Van Bockmeer, F., Clayton, E. 1982. Measure of cell proliferation and cell mediated contraction in 3-dimensional hydrated collagen matrices. *Tiss. Cult. Methods*. **7**: 167-169.
68. van Pelt, A., Roepers, H., Gademan, I., Creemers, L., De Rooij, D., Van Dissel, F. 2002. Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology*. **143**: 1845-1850
69. Vunjak-Novakovic, G., Freshney, R. 2006. Culture of cells for tissue engineering. Editorial Wiley-Liss. New Jersey, Estados Unidos.
70. Weissman, I. 2000. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. **287**: 1442-1446.
71. Wyns, C., Curaba, M., Martínez-Madrid, B., Van Langendonckt, A., Francois-Xavier, W., Donnez, J. 2007. Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Human. Reprod.* **22**:1603-1611.
72. Yan, W.; Souinen, J. y Toppari, J. 2000. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis *in vitro*. *J. Cell Science*. **113**: 161-168.
73. Yeh, J., Zhang, X., Nagano, M. 2007. Establishment of a short-term *in vitro* assay for mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* **77**:897-904.

74. Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y., Nishimune, Y. 2003. Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol. Reprod.* **69**: 1303-1307.
75. Yoshida, S. 2010. Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Develop. Growth. Differ.* **52**: 311-317

Consultas en línea:

76. Cultek. Documento de aplicación: cultivos celulares. [en línea]. 2007. Disponible en: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf. [consulta: 8 de noviembre de 2011].
77. Elhija, M.; Lunenfeld, E.; Schlatt, E. y Huleihel, M.. Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in a soft agar cultura system. [en línea]. 2011. Disponible en: <http://www.nature.com/aja/journal/vaop/ncurrent/full/aja2011112a.html>. [consulta: 30 de enero de 2012].
78. Im, J., Song, S., Kim, J., Kim, K., Baek, S., Lee, D., Suh, W. Vascular differentiation of multipotent spermatogonial stem cells derived from neonatal mouse testis. [en línea]. 2012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257887>. [consulta: 05 de febrero de 2012].
79. Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Morimoto, H., Ogura, A., Shinohara, T. Serum-and feeder- free culture of mouse germline stem cells. *Biol. Reprod.* [en línea]. 2010. Disponible en:

<http://www.biolreprod.org/content/early/2010/09/15/biolreprod.110.086462.short>.

[consulta: 2 de abril de 2011].

80. <http://mural.uv.es/jorvaor/celsmadrenicho.pdf>. [consulta: 25 de enero de 2012].

81. http://www.cgcom.org/europa_al_dia/2003/104. [consulta: 15 de diciembre de 2011].

82. http://medicosenformacion7.tripod.com/21_005.jpg. [consulta: 25 de enero de 2012].

83. Vivas, G., Lozano, J., Velasco, J. Regulación inmuno-testicular y citocinas. [en línea].

2007. [consulta: 25 de enero de 2012]. Disponible en:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-

[51332007000100011&lng=en&nrm=iso&ignore=.html](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332007000100011&lng=en&nrm=iso&ignore=.html)

84. Zamudio, T. Regulación de las biotecnologías. 3.2. Células madre: embrionarias y de adulto. [en línea]. 2005. <http://www.biotech.bioetica.org/clase2-17.htm>. [Consulta: 13 de marzo de 2011].

11. APÉNDICES

11.1. Medios y soluciones utilizadas en cultivo celular

11.1.1 Solución Buffer de Fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio (1litro)

NaCl.....	8 grs.
KCl.....	0,2 grs.
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O.....	2,9 grs.
KH ₂ PO ₄	0,2 grs.
Agua destila.....	1000 mL.

Esterilización: autoclavar.

11.1.2 Medio DMEM (1 litro)

Sobre de medio DMEM.....	1
NaHCO ₃	3,7 grs.
Agua destilada.....	1000 mL.

Esterilización: filtrar.

11.1.3 Medio nutritivo (100 mL)

Medio DMEM.....	90 mL.
Suero fetal bovino.....	10 mL.
Glutamina.....	1 mL.
Piruvato de sodio.....	1 mL.
Estreptomicina.....	40 µL.
Gentacina.....	62,5 µL.

Esterilización: filtrar.

11.1.4 Solución de tripsina 0,25 (1 litro)

NaCl.....	8 grs.
KCl.....	4 grs.
NaHPO ₄ 12H ₂ O.....	0,1 grs.
Triz base.....	3 grs.
Penincilina G.....	0,06 grs.
Glucosa.....	1 gr.
Rojo fenol.....	0,01 grs.
Tripsina.....	1 gr.
Agua bidestilada desionizada.....	1000 mL.

Esterilización: filtrar.

11.1.5 Gelatina al 1% (100 mL)

Gelatina.....	1 gr.
Agua bidestilada desionizada.....	100 mL.

Esterilización: autoclavar.

11.1.6 Solución EDTA 0,02%

EDTA.....	0,2 grs.
Agua destilada.....	1000 mL.

Esterilización: autoclavar.

11.1.7 Soluciones STOCK de de Factor de células madre (SCF)

Suero albumina de bovino.....	10 µL.
Factor SCF.....	100 ng.
Solución PBS.....	10 mL.

11.1.8 Medio inductor (50 mL)

Medio nutritivo.....	50 mL
Solución de factor SCF.....	500 µL.

11.1.9 Solución de equilibrio para la vitrificación (100 mL)

Etilenglicol.....	20 mL.
PBS.....	80 mL.

11.1.10 Solución de vitrificación sin suero (100 mL)

Etilenglicol.....	40 mL.
Ficoll.....	10 mL
Sacarosa.....	42 mL.

Nota: luego se mezcla con 20 mL de suero fetal bovino antes de usar.

11.1.11 Medio de congelación (100 mL)

Medio nutritivo.....	90 mL.
Glicerol.....	10 mL.

11.2. Extracción de colágeno tipo I a partir de la cola de rata

La cola se separa de la rata y se coloca en etanol al 70% por 1 hora, realizando dos cambios de 30 minutos. luego se elimina la piel y se corta en segmentos de aproximadamente 3 cm y se incuba de nuevo en etanol al 70% por 30 minutos, se transfiere a PBS y se deja incubando por 30 minutos. Posteriormente se realizan tres lavados con PBS y se procede a extraer los tendones. El peso en gramos de los tendones permite estimar teóricamente la concentración de colágeno, para ello, se colocan los tendones en una placa de petri seca estéril previamente pesada. Por cada 0,5 gramos de tejido pesado se coloca 100 mL de Ácido acético al 0,01% y se deja en agitación continua por 48 horas a 4°C. Finalmente el extracto obtenido se centrifuga a 25.000 g por 45 minutos. La solución stock al 0,5% se mantiene a 4°C, hasta su posterior uso en la preparación de los geles de colágeno. El pH de la solución de colágeno se ajusta a 7.4 con hidróxido de sodio.

11.3. Soluciones colorantes

Solución de Ácido Peryódico al 5% (100 mL)

Ácido peryódico.....	0,5 grs.
Agua destilada.....	100 mL.

Solución de Schiff de Coleman (100 mL)

Fucsina básica.....	0,5 grs.
Agua destilada.....	100 mL.