

UN NOU SISTEMA DE CULTIU EN DUES FASES ÉS CAPAÇ D'INCREMENTAR LA POBLACIÓ PUTATIVA DE CÈL·LULES MARE DE LES ESPERMATOGÒNIES, SELECCIONAR-LES I MANTENIR-LES EN UN ESTAT INDIFERENCIAT

Alba Vila, Rita Vassena, Anna Veiga i Juan Carlos Izpisua

Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona. albavilacasademunt@hotmail.com.

Resum

Les cèl·lules mare de les espermatogònies (SSC, *spermatogonial stem cells*) són la població del túbul seminífer amb capacitat d'autorenovació, responsable de l'equilibri entre generació i diferenciació en el procés de formació de cèl·lules germinals durant la maduresa sexual masculina en mamífers. Les SSC mantenen l'índex d'espermatogènesi en un estat estable, mitjançant un equilibri entre generació i diferenciació, procés que es troba críticament lligat a la demanda tissular. Les SSC han estat reconegudes per la seva capacitat de repoblació de testicles estèrils després del seu trasplantament, i podrien arribar a ser utilitzades per a la recuperació de la fertilitat en nens que han superat teràpies que, de manera invasiva, han pogut afectar la seva funció reproductiva (radioteràpia i quimioteràpia). L'entrebanc més important amb el qual ens trobem és l'escassa proporció de SSC que trobem *in vivo*, i la necessitat de realitzar una biòpsia com menys invasiva millor en pacients d'aquestes característiques. Aquí es descriu el desenvolupament d'un sistema de cultiu *in vitro* que permet mantenir la població de SSC en un estat indiferenciat, que n'afavoreix la selecció respecte d'altres tipus cel·lulars i en potencia l'augment proporcional. El protocol de cultiu està compost per dues fases: un cultiu tissular inicial seguit d'un cultiu cel·lular posterior. El primer pas està basat en el cultiu de peces de teixit aprofitant la situació que, *in vivo*, ens trobem en el nínxol on resideixen les cèl·lules mare, situat al compartiment basal dels túbuls. En el segon joc d'experiments, aquest cultiu va ser detingut en un punt temporal específic per tractar les peces de teixit i obtenir-ne una suspensió cel·lular, que va ser posada en cultiu en plaques de laminina.

Paraules clau: cèl·lules mare de les espermatogònies, nínxol.

Abstract

Spermatogonial stem cells (SSCs) are the self-renewing population in the testicular stem cell niche responsible for the continuous spermatogenesis throughout postpuberal male life in mammals. SSCs keep the steady state of spermatogenesis, with a self-renewal and differentiation equilibrium which depends on the demand of the testis. SSCs have been shown to repopulate a sterile testis after a transplant in a number of mammals, and could be used for restoring fertility in children surviving therapies affecting their reproductive function (irradiation and chemotherapy). A mayor hurdle towards achieving this goal is the scarcity of SSCs *in vivo*, and the need to perform the smallest testicular biopsy possible in pediatric patients. We report here the development of an *in vitro* culture system capable to maintain SSCs in an undifferentiated state, favoring their selection against other cell types in the seminiferous tubules, and increasing their overall population. The culture protocol is formed by two subsequent steps, an initial tissue culture phase followed by a cell culture phase. The first step is based in the culture of tissue pieces of seminiferous tubules, taking advantage of the *in vivo* position of stem cell niche. The second step is based in a cell-free simple cell culture system.

Key words: spermatogonial stem cells, niche.

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

Les cèl·lules mare de les espermatogònies (SSC, *spermatogonial stem cells*) són la població del túbul seminífer del testicle amb capacitat d'autorenovació, responsable de l'equilibri entre generació i diferenci-

ció en el procés de formació de cèl·lules germinals durant la maduresa sexual masculina en mamífers.

A escala cel·lular, l'epiteli seminífer està compost per les cèl·lules germinals (espermatogònies), que proliferen i es diferencien a espermatozoides, procés que es troba críticament lligat a la demanda tissular,

i les cèl·lules somàtiques, o de Sertoli, que sostenen les cèl·lules germinatives mitjançant les seves extensions citoplasmàtiques, englobant els diferents estadis de diferenciació en aquest procés d'espermatogènesi, i intervenint, així, en la seva nutrició i regulació. Una làmina basal separa l'epiteli seminífer del teixit connectiu circumdant. En aquest teixit és on trobem les cèl·lules de Leydig, que produeixen la testosterona.

Estructuralment, el compartiment germinal es pot dividir també en dues fraccions, depenent de la seva situació respecte a la barrera hematotesticular. Aquesta dicotomització es troba en consonància amb el nivell de diferenciació cel·lular.

La població d'espermatogònies es troba adjacent a la membrana basal, fora de la barrera hematotesticular i, per tant, sota la influència dels factors circulants. Són una població força desconeguda de la qual s'ha reconegut, en estudis anteriors en mamífers, una capacitat de repoblació de testicles estèrils després del seu trasplantament. Aquesta possibilitat podria ser utilitzada per a la recuperació de la fertilitat en nens que s'han de sotmetre a teràpies invasives, com podria ser la quimioteràpia o la radioteràpia, les quals poden arribar a afectar la seva fertilitat. Actualment, la taxa de supervivència acumulativa al càncer a Espanya en nens de 0 a 14 anys és del 65 % (font: ACCIS, Automated Childhood Cancer). D'aquesta manera, la malaltia es podria considerar una situació transitòria de l'edat infantil. Els efectes d'aquest procés, però, poden passar a ser permanents, i dificultarien, per tant una vida reproductiva normal.

L'objectiu d'aquest estudi és optimitzar el cultiu de les SSC per aconseguir una població capaç de restaurar la fertilitat en aquests casos. El principal entrebanc que apareix, però, és l'escassa proporció d'aquest tipus cel·lular entre la totalitat de les cèl·lules del testicle. Així, aquest nombre, tenint en compte la quantitat de material obtingut a partir d'una biòpsia testicular, a causa de la impossibilitat lògica de recollir, en humans, grans quantitats d'aquest teixit, seria significativament més reduït.

El nostre objectiu consisteix, d'una banda, a ampliar el nombre de cèl·lules a partir de quantitats molt limitades de material, mitjançant un protocol de cultiu *in vitro* en dues fases, potenciant l'augment proporcional d'aquest tipus cel·lular i mantenint-lo, al mateix temps, en un estat indiferenciat. D'altra banda, se'n pretén afavorir la selecció específica respecte a la resta de tipus cel·lulars.

MATERIALS, MÈTODES I RESULTATS

La primera etapa del protocol es basa en el cultiu de porcions reduïdes de teixit seminífer, intentant mantenir durant un període de temps limitat la situació en la qual es troben les SSC en condicions *in vivo*, en el microambient del seu nínxol, situat en el compartiment basal dels túbuls seminífers, potenciant-ne d'aquesta manera l'expansió.

Es van utilitzar ratolins adults de la soca C57Bl6. El teixit testicular va ser explantat, la túnica albugínia va ser retirada de manera mecànica, i els túbuls seminífers, en porcions d'aproximadament 10-20 µg, es van posar en cultiu reposant sobre una membrana estèril de niló de 70 µm. Per extreure de manera comparativa l'efecte del medi sobre el cultiu, es van testejar tres situacions. Així, es va provar el cultiu en un medi derivat del Stem Pro-34, en DMEM, i en DMEM amb factors de creixement, EGF i GDNF. El GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), i l'EGF (*epidermal growth factor*), són secretats per les cèl·lules de Sertoli en condicions *in vivo*, i han estat assenyalats com a factors de creixement bàsics per promoure la proliferació de les espermatogònies indiferenciades, tant *in vivo* com *in vitro*.

El cultiu va ser aturat en diferents temps, i els túbuls seminífers van ser digerits per formar una suspensió cel·lular, amb la qual, mitjançant l'anàlisi per FACS (*fluorescence activated cell sorting*), es va poder extreure, de manera percentual, la població Cd90⁺ i Cd49f⁺. Aquests dos marcadors han estat considerats, en nombrosos treballs anteriors, determinants per a la caracterització d'aquesta població en ratolí. Tot que, tal i com s'ha comentat anteriorment, aquest tipus cel·lular no posseeix encara un panell de marcadors estandarditzat per a la caracterització, ja que se'n té poca informació, es va optar per utilitzar aquests dos com a base de classificació fenotípica. A més a més, en el mateix moment, se'n va fer una anàlisi de la viabilitat i de la quantitat de DNA. Aquest disseny experimental ens va permetre determinar la proporció comparativa de cada població cel·lular i la viabilitat del cultiu en el temps, i també identificar el punt en què les considerades SSC presentaven una proporció percentual més elevada. Sis dies després del començament del cultiu la proporció de cèl·lules CD90⁺, viables i diploides, era de 13 + 6,4, 22 + 12,4 i 35,2 + 6,8 en SP34, DMEM, i DMEM + EGF + GDNF, respectivament ($p < 0,05$). El dia 10 els valors eren de 10 + 3,5, 19 + 4,7 i 37 + 3,2, respectivament ($p < 0,01$). El dia 12, però, les cèl·lules van començar a perdre ràpida-

ment la viabilitat i el percentatge de cèl·lules Cd90⁺ va caure fins a un 5 % en tots els tractaments. Les SSC recollides els dies 6 i 10 eren viables i podien ser cultivades *in vitro*.

En la segona etapa del protocol, quan el punt temporal màxim de la població Cd90⁺ i Cd49f⁺ va ser determinat, les porcions tissulars van ser digerides i sotmeses a successius rentatges. Així mateix, es va sotmetre la suspensió cel·lular, mitjançant l'ús d'anticossos contra Cd49f, al MACS (*magnetic activated cell sorting*), amb el qual es va aconseguir una suspensió cel·lular més homogènia. Aquests rentatges van ser posats en cultiu en plaques amb laminina en un medi derivat del Stem Pro 34 amb factors de creixement additius.

Els resultats obtinguts mostren que és possible mantenir el compartiment basal en unes condicions correctes aproximadament durant deu dies *in vitro*. Les cèl·lules d'aquest compartiment, les SSC putatives, augmenten en percentatge entre els dies 6 i 9, però la viabilitat del cultiu a partir d'aquest punt disminueix de manera irreversible, a causa de l'estrès i de la situació d'hipòxia a la qual estan sotmeses. L'augment substancial del nombre de cèl·lules obtingudes permet plantejar la possibilitat del trasplanta-

ment per demostrar la seva capacitat de repoblar testicles estèrils en ratolí i seguir els estudis extrapolant-los a humans.

BIBLIOGRAFIA

- CONRAD, S.; RENNIGER, M.; HENNENLOTTER, J. [*et al.*] (2008). «Generation of pluripotent stem cells from adult human testis». *Nature*, 456(7220): 344-349.
- DHUP, S.; MAJUMDAR, S. S. (2008). «Transgenesis via permanent integration of genes in repopulating spermatogonial cells *in vivo*». *Nat. Methods*, 5(7): 601-603.
- JAHNUKAINEN, K.; EHMCKE, J.; NURMIO, M. [*et al.*] (2007). «Irradiation causes acute and long-term spermatogonial depletion in cultured and xenotransplanted testicular tissue from juvenile nonhuman primates». *Endocrinology*, 148(11): 5541-5548.
- NURMIO, M.; TOPPARI, J.; KALLIO, J. [*et al.*] (2009). «Functional *in vitro* model to examine cancer therapy cytotoxicity in maturing rat testis». *Reprod. Toxicol.*, 27(1): 28-34.
- OATLEY, J. M.; AVILA, D. M. DE; REEVES, J. J. [*et al.*] (2004). «Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells». *Biology of Reproduction*, 70(3): 625-631.