

CÉLULAS MADRE **ESPERMATOGONIALES EN EL** **CONTEXTO DEL NICHO**

Al-Asmar Piñar, Nasser
Herrero Zapata, Javier
Iniesta Mirón, Ignacio
Liñán Tegedor, Alberto
Reyes Palomares, Arturo
Vallejo Ortega, Jorge

RESUMEN

Históricamente, la espermatogénesis en mamíferos ha sido estudiada como un ejemplo del sistema de células madre (SCs). Las células madre espermatogoniales (SSCs) tienen capacidad de autorenovación y diferenciación en células de la línea germinal. Están controladas por la integración de factores intrínsecos y por las señales extrínsecas suministradas por el microambiente, conocido como nicho. La identificación de éste y la caracterización de sus componentes, pueden ser de vital importancia para mejorar las aplicaciones clínicas de las SSCs. Los procesos de modelización podrían ser una herramienta muy útil para la comprensión del sistema y elaboración de predicciones que faciliten el desarrollo experimental del estudio.

1. Células madre y células madre espermatogoniales

Las **células madre** (SC, del inglés, Stem Cells) están definidas por tres propiedades fundamentales: (i) la capacidad de autorenovarse y reemplazarse a sí mismas, (ii) la capacidad de diferenciarse en uno o más linajes o tipos celulares especializados y (iii) el enorme potencial proliferativo para renovar y mantener los tejidos en los que se encuentran (*Gargett CE, 2007*). Existen dos tipos de divisiones que pueden sufrir las SCs, **divisiones simétricas** y **divisiones asimétricas**. Las primeras comprenden a su vez dos posibilidades, una división simétrica que dé lugar a dos SCs o bien que genere dos células progenitoras que posteriormente se diferenciarán hacia algún linaje celular. Las divisiones asimétricas generarán una SC y una célula progenitora. El compromiso de la célula progenitora formada hacia una determinada diferenciación puede ser adquirido de dos maneras, (i) que los determinantes de destino celular en la SC estén distribuidos asimétricamente y heredados de forma mayoritaria por la célula progenitora, o por el contrario, (ii) que sea la salida del microambiente la que determine el inicio de la diferenciación (*Wilson A et al, 2006*).

A estas características habría que añadir la capacidad de mantener la quiescencia, someterse a apoptosis y migrar fuera del nicho (*Dadoune JP, 2007*).

Las SCs adultas de los testículos, llamadas **células madre espermátogoniales** (SSCs, del inglés, Spermatogonial Stem Cells), están localizadas en la periferia de los túbulos seminíferos flanqueadas por las células de Sertoli. Desde la pubertad, las SSCs empiezan a diferenciarse y a producir espermatozoides maduros. Este proceso de espermatogénesis ocurre durante toda la vida reproductiva del hombre, y está asegurado por la capacidad de autorenovación de las SSCs (*Ellen G et al, 2007*).

Las SSCs provienen de las **células madre primordiales** (PGCs, del inglés, Primordial Germ Cells), las cuales derivan de las células epiblasticas pluripotentes (*Ellen G et al, 2007*). Tras la migración de las PGCs a las crestas gonadales, donde proliferan e incrementan su número (*Hogan B et al, 1994*), se diferencian en gonocitos al quedar localizadas en los cordones seminíferos. Los gonocitos proliferan durante un tiempo, se vuelven quiescentes y reanudan su actividad durante la primera semana postnatal (*Olive V et al, 2005*).

La diferenciación germinal en los testículos de ratón comienza desde una pequeña población de células ($2-3 \times 10^4$ por testículo adulto) llamadas espermátogonias A_s (del inglés, **A_{single}**). Parte de las células generadas por división de las células A_s permanecen conectadas después de la mitosis y contribuyen a su renovación. Por otra parte, una serie de divisiones mitóticas sucesivas da lugar a las células A_a (del inglés, **A_{aligned}**), que seguirán conectadas por puentes citoplasmáticos pudiendo generarse cadenas de más de 16 células (*de Rooij DG et al, 1998*). Éstas a su vez dan lugar a las

espermatogonias A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , intermedias y tipo B, que se dividen finalmente en espermatocitos entrando a continuación en la primera división meiótica (Figura 1) (Olive V et al, 2005).

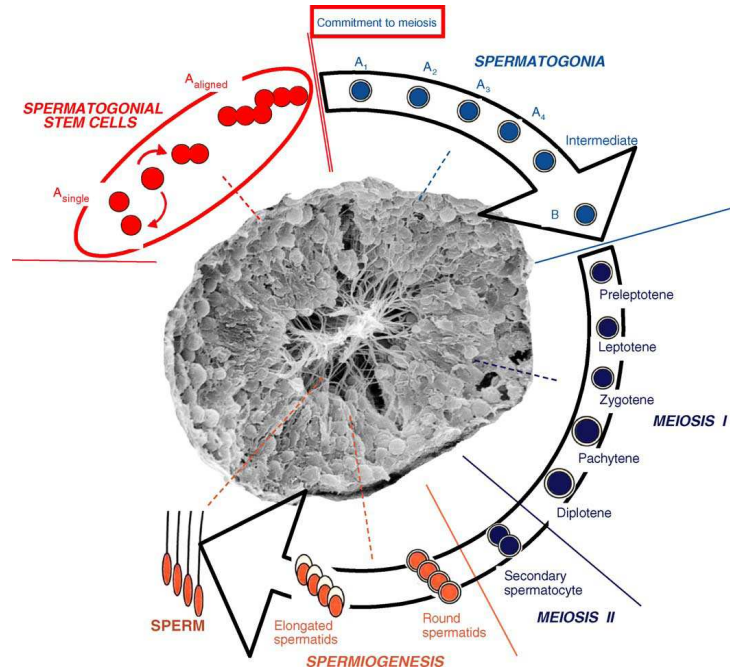


Figura 1. Espermatogénesis. Compartimentos de las SSCs, células espermatogoniales, meióticas y post-meióticas y su localización en los túbulos seminíferos. Las divisiones en el compartimento de las SSCs (en rojo) son asincrónicas, en contraste con el programa fuertemente regulado en las espermatogonias comprometidas y las siguientes fases (modificado de Rooij & Grootegoed, 1998). Las líneas discontinuas indican compartimentos del túbulo donde la diferenciación tiene lugar y no células específicas.

En términos funcionales, la fracción A_s está dotada con las propiedades de las SCs (Olive V et al, 2005). La funcionalidad de las células A_a aún es controvertida. Podrían ser parte de la fracción de SSCs, o estar ya comprometidas irreversiblemente en la ruta de diferenciación. La densidad celular se regula por una gran apoptosis de las espermatogonias A_2 a A_4 (de Rooij DG et al, 1998).

En humanos se reconocen dos tipos de espermatogonias, las A_{dark} , que son las SSCs propiamente dichas, con una baja actividad mitótica en condiciones normales, función regenerativa y que se corresponderían con las espermatogonias A_{single} de ratón; y las A_{pale} , que tienen función de células

progenitoras que producen un elevado número de células hijas diferenciadas y se corresponderían con las espermatogonias $A_{aligned}$ de ratón (*Dadoune JP, 2007*)

En contraste con este detallado análisis anatómico, la ausencia de marcadores específicos moleculares para las SSCs dificulta la detección y aislamiento de estas células. Muchos de los marcadores moleculares determinantes de pluripotencia y autorenovación de las **células madre embrionarias** (ESCs, del inglés, Embryonic Stem Cells), no se expresan en las SSCs (*Oatley JM et al, 2006*). Algunos autores señalan a c-Ret, receptor tirosina kinasa para GDNF (Glial cell-line-Derived Neurotrophic Factor), como posible marcador potencial para espermatogonias indiferenciadas de ratón (*Dadoune JP, 2007*). Por el contrario, c-kit, otro receptor tirosina kinasa que está presente en la superficie celular de ESCs y de nuevo en las espermatogonias diferenciadas, no se expresa en las SSCs (*Shinohara T et al, 2000*). Otros autores identificaron un marcador, **GPR125**, que sólo se encuentra en la superficie de SSCs. El examen histoquímico postnatal revela que la expresión de este marcador estaba restringida a la primera capa de células adyacentes a la membrana basal de los túbulos seminíferos (*Seandel M et al, 2007*).

El actual entusiasmo por la medicina regenerativa asociado al interés por las SCs (tanto embrionarias como adultas) está basado en la hipótesis de que podemos aislarlas de su hábitat natural, reproducirlas en cultivo para transplantarlas a un ambiente distinto y asumir que estas células se comportarán de una manera determinada, o que podemos manipularlas *in vivo* obteniendo los resultados deseados (*Fuchs E et al, 2004*). Sin embargo,

existen enormes diferencias entre lo que las SCs pueden hacer en su hábitat original y lo que pueden hacer cuando se cultivan o se transplantan a un lugar distinto (*Anderson DJ, 2001*). Quizás el mayor desafío en la biología de las SCs sea descubrir los mecanismos que determinan cómo la célula hija resultante de una división participa en la autorenovación o se compromete hacia una diferenciación ya establecida (*Raff M, 2003*)

2. El nicho de las SCs

El mantenimiento y la supervivencia de las SCs están regulados por las señales de su microambiente local, frecuentemente denominado nicho. El **nicho** se podría definir como un compartimento anatómico determinado, que integra señales tanto externas como de las propias SCs. A su vez transmite información a las SCs a través de moléculas de superficie celular y moléculas secretadas para controlar su tasa de proliferación, mantener la pluripotencialidad y determinar el destino de las células hijas en proceso de diferenciación (*Jones DL et al, 2008*). Generalmente se encuentra localizado en un lugar poco accesible al ambiente externo para proteger las SCs de los posibles daños genéticos ocasionados por el estrés (*Ogawa T et al, 2005*).

Estudios en varios organismos modelo han revelado algunos rasgos de los nichos que son importantes para controlar el comportamiento de las SCs (*Jones DL et al, 2008*):

- 1) Las señales que emanan del nicho regulan la autorenovación, supervivencia y mantenimiento de las SCs.
- 2) La particular relación espacial entre las SCs y las células de apoyo pueden polarizar a las primeras dentro del nicho para promover divisiones asimétricas.

3) La adhesión entre SCs y células estromales de apoyo o la matriz extracelular (MEC) ancla a las primeras dentro del nicho, acercándolas a las señales de autorenovación y supervivencia.

Por tanto, el nicho suministra soporte estructural, sustento trófico, información topográfica y señales fisiológicas para regular la función de las SCs (Jones DL et al, 2008).

3. Componentes y funciones de los nichos de SCs

Los componentes de un hipotético nicho se podrían resumir en: a) las propias SCs, b) las células estromales, c) los factores solubles, d) las proteínas de la MEC, e) las señales topográficas, f) la red vascular y g) las señales neurales (Figura 2). Es conveniente subrayar que es improbable que se encuentren todos estos componentes en cada nicho, sino más bien una adaptación del modelo general de nicho a cada microambiente en los distintos tejidos (Jones DL et al, 2008).

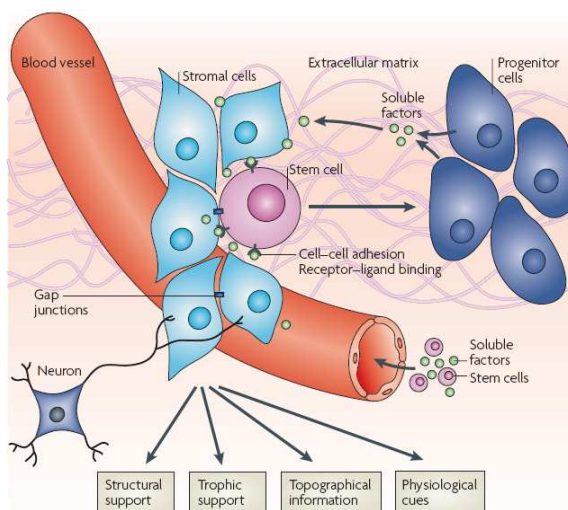


Figura 2. El nicho representa una entidad dinámica y compleja en la que la integración de múltiples señales consigue un control del número y función de las SCs (Jones, D.L. 2008).

Los componentes candidatos a formar el nicho de las SSCs incluyen las células de Sertoli, la membrana basal del túbulo seminífero, las células mioides peritubulares y las señales externas (Jones DL et al, 2008).

3.1. Células estromales de apoyo de las SSCs (células de Sertoli)

Aunque las **células de Sertoli** comprenden solamente un 3% de la población celular del testículo (*Bellve AR, 1993*), son las únicas células somáticas que interaccionan directamente con las células germinales y por lo tanto constituyen el componente primario celular del nicho de la línea germinal (*Spradling A et al, 2001*). Las células de Sertoli dividen el túbulo seminífero en zona basal, donde residen las espermatogonias, y zona adluminal, donde se van diferenciando. Estas regiones quedan separadas por la **barrera hemato-testicular** conformada por las uniones estrechas (tight-junctions) entre las células de Sertoli (*Ogawa T et al, 2005*).

3.2. Factores solubles

Se conocen algunas proteínas clave producidas por las células de Sertoli y que afectan al comportamiento de las SSCs. El **GDNF**, ya comentado anteriormente, es una proteína secretada perinatalmente. Regula la autorenovación y supervivencia de las SSCs durante algún tiempo después del nacimiento (*Ebata KT et al, 2005, Hess RA et al, 2006a*). Interactúa con los receptores GRH α 1/RET de las SSCs (*Meng X et al, 2000, Yomogida K et al, 2003*) y regula la actividad de varios genes relacionados con la autorenovación y supervivencia celular como el *Bcl6b*, un represor transcripcional (*Oatley JM et al, 2006*).

Mientras que el GDNF resulta de vital importancia para la supervivencia espermatogonial en la etapa perinatal, el **ERM** es un factor de transcripción secretado por las células de Sertoli que también cumple ese papel pero a partir de la pubertad y durante la vida adulta (*Hess RA et al, 2006a*). Este factor

promueve la expresión de genes específicos de espermatogonia como *Stra8*, *Crabp*, *Lsh*, *Rbm* y *Plzf* (Chen C et al, 2005).

Ratones knock-out para ERM serían capaces de completar una primera ronda de espermatogénesis, pero posteriormente no sólo pierden la capacidad de generar esperma sino que sus poblaciones SSCs se degradan progresivamente hasta desaparecer (Hess RA et al, 2006b). (Figura 3)

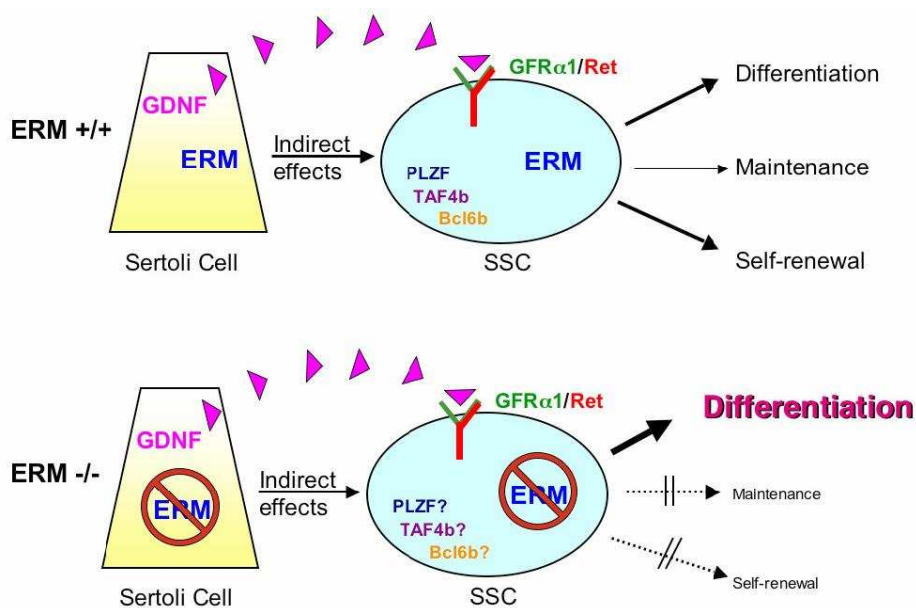


Figura 3. Factores necesarios para el mantenimiento de las SSCs. En ratones con testículos ERM -/-, la espermatogénesis se pierde debido a un fallo de la autorenovación y/o mantenimiento de las SSCs. Otros factores importantes son GDNF, PLZF, TAF4b y Bcl6b. GDNF es secretado por las células de Sertoli y actúa a través de sus receptores, GFRα1 y RET, en la superficie de las SSCs. En ratones con testículos ERM-/-, los niveles de GDNF no están alterados pero la pérdida de ERM podría influir sobre los receptores de GDNF alterando su vía de señalización (Hess RA et al, 2006a).

Otro de los factores secretados por las células de Sertoli es el factor de célula madre (SCF), que afecta a las SSCs a través del receptor c-kit, específico de las espermatogonias tipo A en diferenciación (Ohta H et al, 2003). El factor *Plzf* (Promyelocytic Leukaemia Zinc-Finger) parece regular el estado epigenético de las SSCs indiferenciadas. Se perfila como un factor de automantenimiento de las SSCs, regulador del balance entre los procesos de

autorenovación y diferenciación. Este mismo factor interactuaría con elementos de la ruta de señalización derivados de las respuestas de las células de Sertoli como GDNF y SCF (Buaas FW et al, 2004).

TAF-4b, un componente del complejo ARN polimerasa que afecta a la regulación transcripcional, es específico de células germinales (Freiman RN et al, 2001). En ratones se expresa en gonocitos postnatalmente y en espermatogonias y espermátidas de adultos. Parece esencial en la proliferación de SSCs ya que los ratones knock-out para TAF-4b tienen problemas con la proliferación de gonocitos y la expresión de c-Ret, Plzf y Str8 (proteínas todas implicadas en la autorenovación y supervivencia de las SSCs) (Falender AE et al, 2005).

Sohlh1 y **2** son dos factores expresados en espermatogonias en proceso de diferenciación (Dadoune JP, 2007). *Sohlh1* parece expresarse fundamentalmente en las etapas tempranas de diferenciación ($A_1 \rightarrow A_4$) y espermatogonias B. Su ausencia bloquearía la diferenciación de las espermatogonias en espermátocitos por la alteración en la expresión de diversos factores (*Kit*, *Ngn3* y *Crabp1*) (Ballow D et al, 2006).

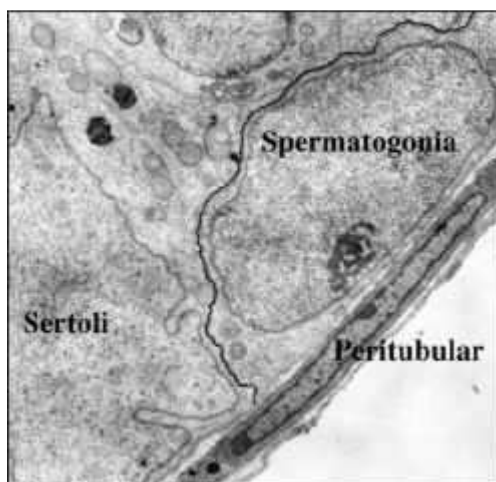


Figura 4. Microfotografía electrónica que muestra la situación de una espermatogonia tipo A junto a la membrana basal y rodeada por células de Sertoli (línea negra). (Hess RA et al, 2006a)

La localización de las SSCs entre la membrana basal y la barrera hemato-testicular (Figura 4), permite que las espermatogonias estén expuestas a sustancias que atraviesan la membrana basal procedentes del espacio intersticial. (*Dadoune JP, 2007*).

3.3. Matriz extracelular

Existen trabajos que muestran la expresión de factores intrínsecos a las SSCs como las integrinas de membrana β -1 y α -6, que tienen capacidad de unión con laminina, componente mayoritario de la membrana basal (*Shinohara T et al, 1999*). La propia unión de las SSCs a la lámina basal y a las células que las rodean a través de integrinas y cadherinas podría intervenir en la regulación de su diferenciación y multiplicación. (*Kubota Y et al, 1988*). Otros trabajos aluden a una distribución dependiente de las células endoteliales vasculares que habiliten en mayor o menor medida la disponibilidad de nutrientes, confinando mayoritariamente a los nichos hacia las regiones intersticiales de los túbulos seminíferos (*Chiarini-Garcia H et al, 2003, Ogawa T et al, 2005*).

3.4. Información topográfica del nicho

La precisa organización topográfica de las SSCs respecto a las células de Sertoli puede desempeñar un importante papel en el correcto mantenimiento del número de las mismas dentro del nicho. Las uniones polarizadas con las células de apoyo o con la MEC, o bien factores localizados asimétricamente dentro del nicho, pueden suministrar señales que orienten la división de las SSCs. De la misma forma, esta disposición puede determinar diferentes destinos celulares para la progenie derivada de las SSCs. La estructura tridimensional en la que residen, incluyendo los componentes de la matriz,

suministran elementos de localización en el nicho que podrían contribuir estimulando o inhibiendo la reserva de SSCs (*Yamashita YM et al, 2003*).

Las PGCs de ratón encuentran múltiples nichos a lo largo de su migración, que influirían de forma diferente a la hora de facilitar la rápida proliferación, imponer la quiescencia celular o mediar en la diferenciación de las células progenitoras hacia un linaje particular. Esta migración cuidadosamente orquestada parece ser regulada por proteínas quimiotácticas y por la localización anatómica de los factores de supervivencia de las PGCs como c-kit (*Yamashita YM et al, 2003*).

En *D. melanogaster*, mediante visualización directa de GSCs (Germline Stem Cells) dentro del nicho, se comprobó que en la división celular, un polo del huso mitótico en cada célula se orientaba hacia las células de apoyo, observándose que la célula hija que permanecía en el nicho mantenía la identidad de SC, mientras que la célula hija que era desplazada del nicho y de las señales de autorenovación, iniciaba el proceso de diferenciación. Sería interesante determinar si la división de las SCs en otras especies se orienta espacialmente de manera similar (*Yamashita YM et al, 2003*).

Habría que definir los conceptos de **nicho restrictivo** (de autorenovación) en contraste con el **nicho permisivo** (proliferativo). El primero albergaría sólo SCs, mientras que el segundo también a otras células en proceso de diferenciación (*Ogawa T et al, 2005*).

Se ha comprobado que las espermatogonias A_s se distribuyen de una manera no aleatoria en el compartimento basal del túbulo seminífero. Se localizan en la membrana basal, preferencialmente en las zonas enfrentadas al espacio intersticial y no en contacto con los túbulos seminíferos adyacentes

(Figura 5). Estas observaciones conducen a la suposición de que existen factores específicos que emanan del espacio intersticial que atraen a las SSCs para colonizar el nicho a lo largo del intersticio (Ogawa T et al, 2005)

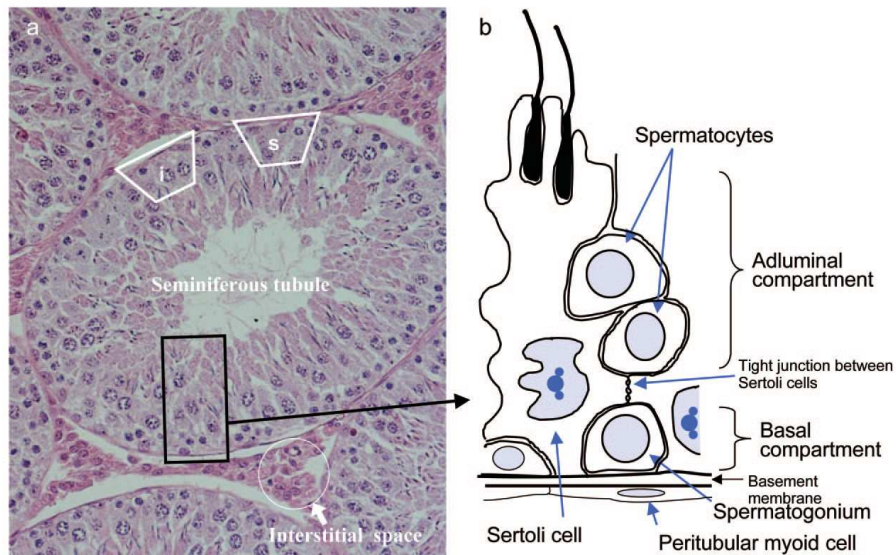


Figura 5. (a) Corte transversal de los túbulos seminíferos de rata. El trapezoide *i* indica la región de la membrana basal enfrentada al intersticio, y el *s* señala la región en contacto con el túbulo seminífero adyacente. (b) Una representación esquemática del epitelio seminífero mostrando los compartimentos basal y adluminal. Cada célula germinal permanece en contacto directo con las células de Sertoli. Las células mioides peritubulares cubren la superficie externa de la membrana basal (Ogawa T et al, 2005)

3.5. Red vascular

Al observar la estrecha asociación entre la localización de las SSCs y el patrón de vascularización, se asume que este último juega un papel importante en la generación y ubicación del nicho (figura 6). La organización del nicho no debe entenderse como un mecanismo predeterminado, más bien como un efecto de múltiples factores, entre otros, las consecuencias del soporte vascular en sí. Esta visión ofrece interesantes perspectivas en el mecanismo de la espermatogénesis, como por ejemplo la estructura discontinua de las regiones con distinto grado de maduración espermática a lo largo del túbulo seminífero (Yoshida S et al, 2007).

Como ya hemos comentado, en el testículo maduro de ratón, las SSCs se suelen localizar preferencialmente en el compartimento basal dentro del túbulo seminífero, próximas a los intersticios y ramificaciones de los vasos sanguíneos. Estas localizaciones, bien definidas, pueden considerarse como los nichos en los que se generan las SSCs. Por ello se especula que las células con mayor pluripotencialidad, las más indiferenciadas, pueden encontrarse en estas regiones. Durante la transición hacia espermatogonias diferenciadas, éstas van dispersándose progresivamente (Yoshida S et al, 2007).

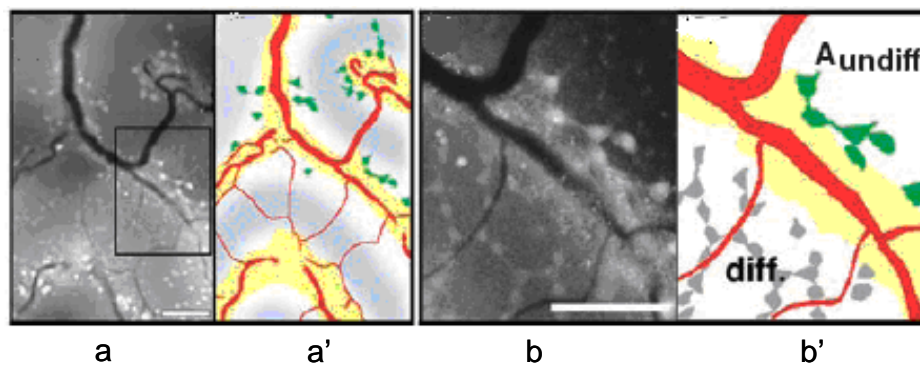


Figura 6. Asociación de vasculatura y localización de las espermatogonias A indiferenciadas marcadas con GFP en el compartimento basal del túbulo seminífero. (a) Imagen tomada con microscopía de fluorescencia de una sección de la pared del túbulo seminífero. (a') Esquema, en verde se ven las espermatogonias indiferenciadas, en rojo los vasos sanguíneos y en amarillo el intersticio; los túbulos seminíferos continúan como está dibujado en azul. (b) y (b') Ampliaciones de la parte de (a) enmarcada por un rectángulo. Se observan las espermatogonias indiferenciadas con mayor fluorescencia, mientras que las espermatogonias en proceso de diferenciación (gris, en b') pierden intensidad (Yoshida S et al, 2007).

El grupo de Yoshida y cols. intentó identificar las causas de la regeneración de la vasculatura experimentalmente. Una posible explicación es un reclutamiento directo de las SSCs por parte de los vasos mediante el transporte de factores implicados en supervivencia y proliferación de las mismas (Yoshida S et al, 2007).

Por otro lado, se especula con la existencia de un nicho vascular asociado a las zonas intersticiales de regeneración. Sin embargo, las SSCs no suelen estar en contacto directo con los vasos sanguíneos, por lo que se propone un mediador o intermediario, las células de Leydig (*Yoshida S et al, 2007*).

3.6. Señales neurales

En experimentos con ratones cuyo sistema nervioso simpático (SNS) estaba alterado, se descubrió que carecían de la habilidad para movilizar a las células madre hematopoyéticas (HSCs, del inglés, Hematopoietic Stem Cells) de la médula ósea. Las entradas del SNS modularían el nicho de manera que podrían cambiar la localización de las HSCs. La extrapolación de esta hipótesis a nuestro campo de estudio nos llevaría a un posible mecanismo por el que las SSCs son capaces de “sentir” los cambios en el estado del tejido o del organismo (*Katayama Y et al, 2006*).

4. Aplicaciones clínicas de las SSCs

4.1. Preservación de la fertilidad

Los progresos en el conocimiento y tratamiento del cáncer están aumentando las probabilidades de superar esta enfermedad. En la actualidad no hay opciones para preservar la fertilidad en pacientes prepuberales, salvo la crioconservación de SSCs. Aunque el principal objetivo es erradicar la enfermedad en el niño, la esterilidad es un grave problema en el contexto de “calidad de vida”. La crioconservación de SSCs antes del comienzo de la quimio/radioterapia seguido de trasplante autólogo intra-testicular tras la remisión de la enfermedad, es una hipotética opción de cara a un futuro reproductivo del individuo (*Geens M et al, 2008*)(*Brinster RL, 2007*). (Figura 7)

Los estudios de transplante de células desde el enfoque de la medicina regenerativa en los tumores germinales, están generalmente obstaculizados por la falta de modelos animales que reúnan propiedades aplicables a humanos; la esperanza es que estos estudios sobre SSCs mejoren nuestro conocimiento de esta enfermedad (*Kanatsu-Shinohara M et al, 2003*).

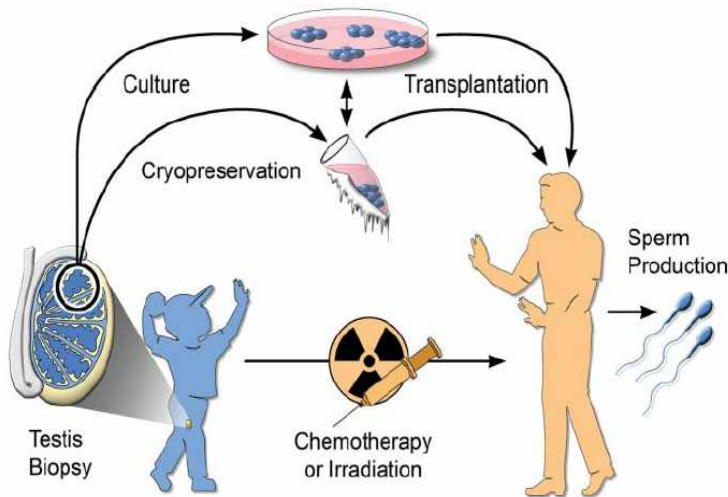


Figura 7. Preservación de las SSCs. Antes del tratamiento de quimio o radioterapia para el cáncer, un joven podría someterse a una biopsia testicular para extraer sus SSCs. Éstas se podrían criopreservar o, después del desarrollo de las técnicas necesarias, podrían ser cultivadas. Tras el tratamiento, las SSCs serán transplantadas a los testículos del paciente para la producción de espermatozoides.

El transplante de SSCs fue realizado por primera vez en ratón por Brinster y cols. en 1994. Las espermatogonias de un ratón donante fértil se inyectaron dentro de los túbulos seminíferos de un receptor estéril, fueron capaces de colonizarlos y, en algunos casos, inducir espermatogénesis (*Brinster RL et al, 1994a*)(*Brinster RL et al, 1994b*). Tras estos estudios iniciales se realizaron más experimentos por diferentes grupos usando muestras tanto frescas como criopreservadas en diferentes especies (*Avarbock MR et al, 1996*).

Algunos autores demostraron que la eficiencia del transplante de SSCs está directamente relacionada con el número de SCs inyectadas (*Dobrinski I et al, 1999*).

Goossens y cols. obtuvieron descendencia viva por transplante de SSCs en ratón, aunque el tamaño de las camadas fue más pequeño en comparación con los controles. Las crías nacidas fueron capaces de producir descendencia normal al menos hasta la tercera generación. Los autores atribuyeron los defectos en el tamaño de la camada a la baja concentración y/o motilidad espermática después del transplante (*Goossens E et al, 2007*).

En contraste con las ESCs, el uso de SSCs permite una terapia celular individualizada, ya que el donante y el receptor son idénticos, evitándose así además el problema ético (*Nayernia K, 2007*).

El hecho de que las SSCs pueden transmitir información genética a la descendencia, hace de ellas una población de células candidatas a la transgénesis. Si fuera legal y éticamente aceptable en humanos, este método podría tener importantes aplicaciones en terapia genética transgeneracional (*Ellen G et al, 2007*).

Otra posible aplicación es la derivación de SSCs para obtener células pluripotentes, lo cual puede ser una alternativa importante al uso de ESCs para terapias de transplante autólogo. Si se consigue aislar estas células, podrán ser reprogramadas y obtener células diferenciadas que puedan ser utilizadas terapéuticamente en el tejido afecto (*Nayernia K, 2007*).

El grupo de Nagano depositó las SSCs fuera del túbulo seminífero, en el espacio intersticial, y comprobó que no permanecieron ni generaron espermatozoides maduros en dicho lugar. Esto indicaría que el compartimento basal del túbulo seminífero es el único sitio donde las SSCs pueden residir y mantenerse. Sorprendentemente se encontró que las SSCs introducidas en el lumen del túbulo alcanzaban el compartimento basal pasando a través de las

uniones estrechas de las células de Sertoli, formando colonias espermatogoniales en la membrana basal. La afinidad de las SSCs por su nicho sería una importante característica de éstas (Nagano MC, 2003). Otros autores encontraron que el número de colonias formadas en testículos de crías era mayor con respecto a los de adultos. Esto podría ser explicado por la ausencia de las uniones estrechas entre las células de Sertoli hasta el día 10-12 postnatal, facilitando el acceso de las SSCs transplantadas a la membrana basal de los túbulos (Shinohara T et al, 2001)

4.2. El nicho como diana terapéutica

Se ha sugerido que el nicho puede ser usado como diana terapéutica en casos donde las funciones de estas células estén alteradas (Figura 8).

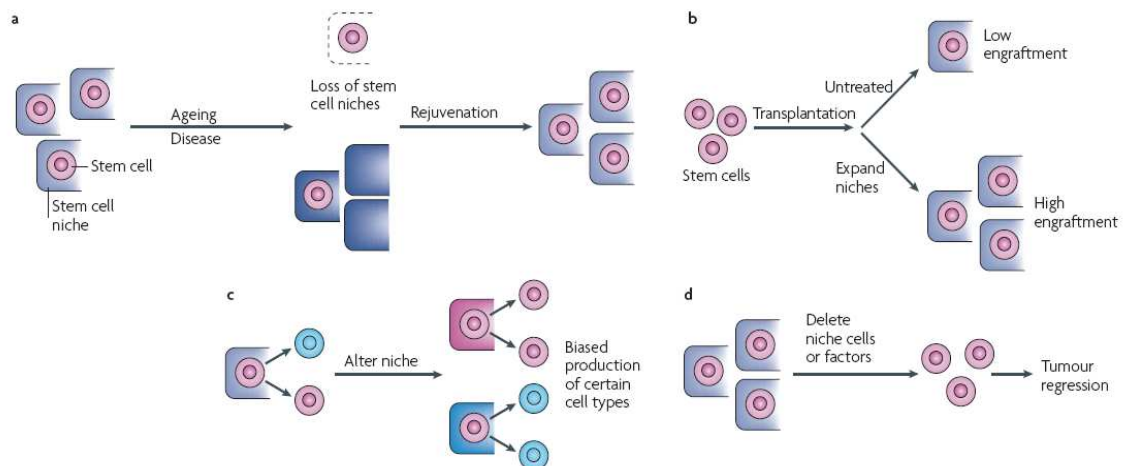


Figura 8. El nicho como diana terapéutica. (a) La corrección de alteraciones asociadas con la edad o enfermedades dentro del nicho podría ser usado para estimular el número o la función de SCs endógenas. (b) Mejorando la función del nicho durante los trasplantes podría mejorar la eficiencia de los injertos o acelerar la reconstitución de las SCs. (c) Una modificación apropiada de las señales del nicho podría ser usada para alterar los resultados de la diferenciación de las SCs favoreciendo la producción del tipo celular necesitado o inhibir la producción del perjudicial. (d) La ablación terapéutica de los componentes del nicho de SCs cancerígenas podría ser una nueva estrategia para erradicar el cáncer. (Jones DL et al, 2008)

Utilizar como diana el microambiente en lugar de dirigir la terapia hacia las propias SCs, ofrece una novedosa herramienta en el marco clínico (Adams GB et al, 2008)

Estudios previos han demostrado la imposibilidad de recuperar la espermatogénesis de SSCs endógenas en testículos de ratones con defectos en el nicho. El grupo de Kanatsu-Shinohara realizó un experimento de **transplante de células de Sertoli** con el objetivo de restaurar la fertilidad en ratones. Utilizaron dos tipos de ratones infértiles, Steel (SI) y White spotting (W) (Figura 9). En células de Sertoli, la ausencia de expresión del factor Steel que codifica para SCF, ligando del receptor c-kit, impide la diferenciación de espermatogonias en ratones SI, resultando en azoospermia. Por el contrario, las células germinales en ratones W tienen mutaciones en el receptor c-kit, causando una condición similar (Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a).

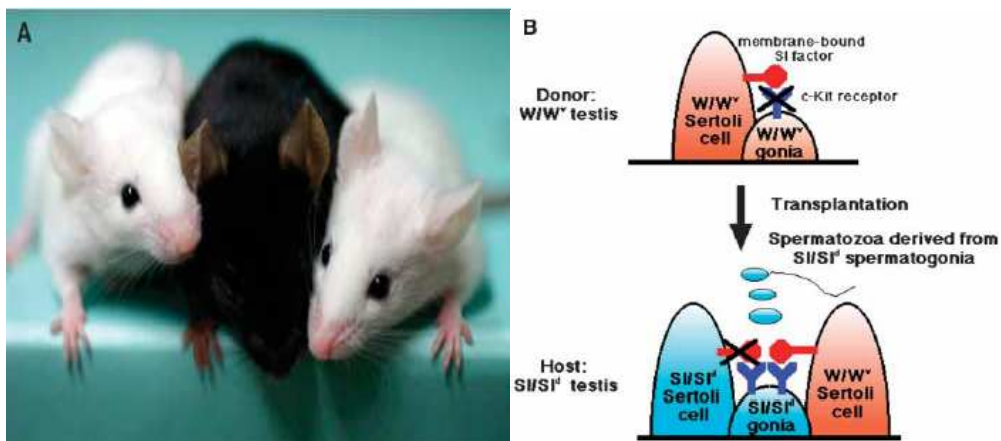


Figura 9. Visión general del transplante de células de Sertoli. (A) Apariencia de los ratones mutantes infértiles White spotting (W) y Steel (SI). W y SI tienen defectos en la hematopoyesis, melanogénesis y gametogénesis atribuibles a defectos en los genes c-kit y SI, respectivamente. Debido a la melanogénesis defectuosa, los mutantes W y SI tienen un pelaje blanco, distinguible de los wild-type (medio), de color negro. (B) Representación esquemática del transplante de células de Sertoli. Las células germinales en los ratones W tienen un defecto en el receptor c-kit y no pueden transducir la señal del factor SI. Por otro lado, las células de Sertoli en ratones SI no expresan la señal de este factor y no pueden inducir la diferenciación germinal normal. El transplante de células de Sertoli de ratones W dentro de testículos SI induce la espermatogénesis de las células germinales endógenas, resultando en la producción de células diferenciadas que portan los genes SI defectuosos (Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a).

Se recogieron células testiculares de ratones W neonatales, y se microinyectó una suspensión celular en los túbulos seminíferos de ratones SI de 4-6 semanas. Los ratones receptores fueron sacrificados a los 2-3 meses

del transplante, y sus testículos fueron analizados histológicamente (Figura 10A) (Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a). Este período de tiempo corresponde con 2 ó 3 ciclos de espermatogénesis en ratón, lo cual podría ser suficiente tiempo para recuperar la fertilidad a partir de SSCs (de Rooij DG et al, 2000). La restauración de la espermatogénesis se observó en 13 de los 24 (54%) testículos receptores. Las células de donante disociadas se reagregaron tras el transplante para formar una estructura similar a túbulos seminíferos (“minitúbulos”), y se detectó espermatogénesis en el 2.2 % de los mismos (Figura 10B y C) (Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a).

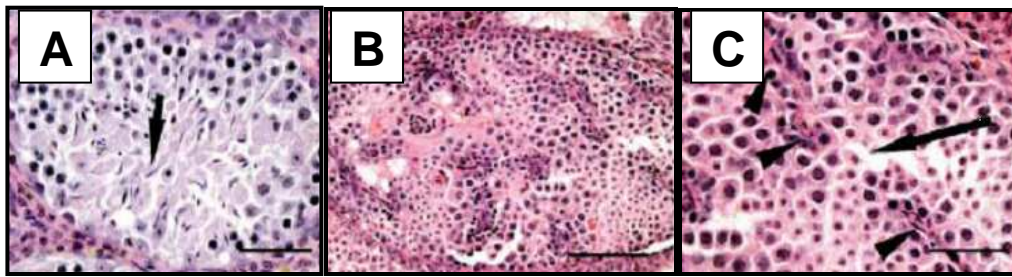


Figura 10. Transplante de células de Sertoli dentro de testículos infértiles SI. (A) Un testículo receptor SI 107 días tras el transplante de células donantes W. Se observan espermátidas elongadas (flecha). (B) Espermatogénesis en los minitúbulos. Prestar atención a la membrana basal interdigitada y la espermatogénesis desorganizada. (C) Aumento de (B). La espermatogénesis ocurre en ambas caras de la membrana basal (cabezas de flechas), pero algunas células germinales parecen migrar a la otra cara (flecha). Tinción con hematoxilina y eosina (Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a).

Las espermatogonias, espermatocitos y espermátidas redondas parecieron morfológicamente normales. También se encontraron túbulos que contenían espermátidas elongadas aparentemente normales en varias secciones, pero su incidencia fue significativamente más baja que la de espermátidas redondas. La formación de los minitúbulos no fue necesaria para la espermatogénesis, ya que se encontró también en áreas sin su formación (Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a).

Para confirmar que las células germinales que se desarrollaron en los testículos huéspedes eran fértiles, se intentó producir descendencia de ratones

receptores SI usando ICSI (del inglés, Intra Cytoplasmatic Sperm Injection). Se fecundaron un total de 136 oocitos usando espermátidas redondas y los 114 (83.8%) que se desarrollaron hasta el estadio de 2 células se transfirieron a hembras pseudopreñadas. Las hembras receptoras produjeron un total de 4 crías (Figura 11A) que tuvieron pelaje negro con una mancha blanca en el vientre, lo que sugiere que fueron heterocigotos SI/+ o SI^d/+ (Figura 11B). El cruce de machos y hembras heterocigotos produjo descendencia normal, lo que indica que la descendencia obtenida de los ratones transplantados es fértil (*Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a*).

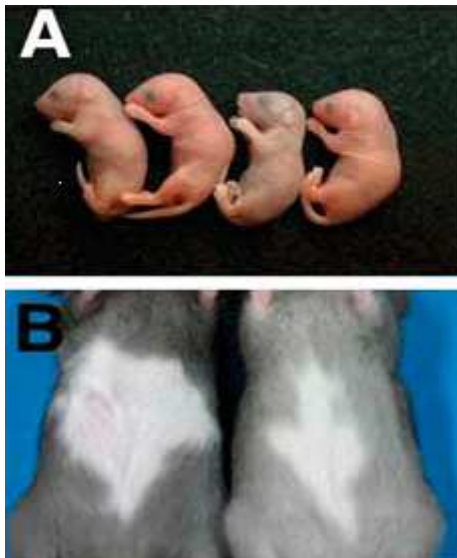


Figura 11. Descendencia producida de machos SI que recibieron un trasplante de células de testículo de donantes W. (A) La descendencia recién nacida producida por microinseminación usando espermátidas redondas. (B). Descendencia madura derivada de la microinseminación. Prestar atención a las manchas blancas en el vientre, lo que sugiere que los animales son SI/+ o SI^d/+ (*Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a*).

La producción de descendencia tuvo una eficiencia muy baja, lo cual sugiere que no todas las células germinales deben haber tenido un desarrollo normal (*Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a*).

La técnica de trasplante no sólo supone un método para estudios básicos de espermatogénesis sino que también puede ser un nuevo método para el tratamiento de infertilidad masculina. Actualmente, se conoce muy poco sobre los genes responsables de la infertilidad masculina, y no hay tratamientos efectivos para hombres infértiles con defectos en las células de

Sertoli (*Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a*). Los testículos de ratones SI tienen características histológicas similares a las observadas en la situación clínica conocida como *síndrome de sólo células de Sertoli*, que aparece en un 5-15% de los hombres infértiles (*DEL CASTILLO EB et al, 1953*).

Este estudio demuestra que los defectos en el nicho de la línea germinal masculina pueden ser corregidos por trasplante de células de Sertoli. Al contrario que el empleo de SSCs, esta técnica permite reemplazar las células estromales defectuosas mediante trasplante heterólogo (*Kanatsu-Shinohara M et al, 2005a*).

4.3. Dificultades del uso de las SSCs

Aunque el trasplante de SSCs es un método usado en investigación con ratones desde hace años (*Brinster RL et al, 1994a, Brinster RL et al, 1994b*) y que ha sido probado con éxito en primates (*Schlatt S et al, 2002*), existen toda una serie de dificultades para la adaptación de la técnica a un uso clínico en humanos (*Geens M et al, 2008*).

En primer lugar, es necesario maximizar la cantidad de SSCs para aumentar las posibilidades de éxito en trasplantes y minimizar la cantidad de tejido biopsiado. En este punto, la dificultad está en el bajo porcentaje de SSCs que se calcula que hay frente al resto de células que componen el testículo (*Tegelenbosch RA et al, 1993*). Nagano en 2003 estimó el número de SSCs de un testículo adulto normal de ratón en aproximadamente 3000 (~0.01% del total de células del testículo) basándose en estudios de eficiencia de colonización (*Nagano MC, 2003*).

Otro asunto de importancia reside en la propia crioconservación. La congelación de espermatozoides se realiza de forma rutinaria en bancos de

semen de todo el mundo (*Garrido N et al, 2008*) y la de corteza ovárica ya tiene una aplicación clínica experimental, pero los protocolos de para tejido testicular humano todavía están en periodo de experimentación (*Kvist K et al, 2006*).

En los casos de pacientes tratados de cáncer, existiría el riesgo al autotrasplantar las células crioconservadas de introducir células germinales cancerosas al organismo (*Geens M et al, 2007*). Una posible solución sería identificar y separar las SSCs del resto de células recuperadas con la biopsia, algo de momento difícil debido a que, como ya hemos comentado, no se conocen marcadores específicos. Se han propuesto diferentes alternativas para resolver estas dificultades, como (i) cultivar SSCs a partir de una biopsia para aumentar su número y aislarlas de las neoplásicas (*Kanatsu-Shinohara M et al, 2005b*), (ii) diferenciar *in vitro* espermatozoides a partir de cultivos de SSCs para evitar el riesgo de reintroducción de células cancerosas (*Feng LX et al, 2002*) e incluso (iii) trasplantar el tejido de la biopsia a un huésped animal para que la espermatogénesis continúe y recolectar los espermatozoides, o para evaluar el riesgo de transmisión de células cancerosas. Sin embargo, éste último método comportaría su propio riesgo, la zoonosis (*Geens M et al, 2006*).

Una dificultad adicional a tener en cuenta es el grado de afectación de los nichos de las SSCs en el paciente debido tanto a la enfermedad como al tratamiento. Si las condiciones de los nichos se vieran alteradas, éstos podrían a su vez perjudicar el resultado del trasplante (*Zhang Z et al, 2007*).

Finalmente, no hay que olvidar el estrés producido en los pacientes al someterse a intervenciones quirúrgicas extra, ya que al tratamiento radio/quimioterápico se le sumarían la biopsia y el posterior trasplante (*Geens M et al, 2008*).

5. Modelización en células madre

Aunque aplicable a otros tejidos, podemos entender el nicho de las SSCs como un sistema biológico, cuya configuración ha debido darse en un contexto evolutivo, a partir de la interacción entre las células que lo constituyen. Para emplear el nicho de SSCs como objeto de estudio hace falta (i) identificar el nicho en sí, (ii) establecer las conexiones entre los elementos que lo forman y por último (iii) desarrollar modelos de estudio *in vitro* o *in silico* que permitan evaluar la homeostasis o las funciones de las células participantes (Viswanathan S et al, 2003).

¿Qué importancia metodológica tiene la aplicación de modelos? (Theise ND, 2002). a) Un modelo **explica** y **asocia** una gran variedad de fenómenos observados y **apoya** la consistencia de los datos obtenidos experimentalmente. b) Las teorías **aportan predicciones** sobre la experimentación directa y futura (anticipan el impacto de manipular el sistema). c) **Facilita la comprensión** de la similitud entre los principios de construcción de los nichos de diferentes tejidos.

En este sentido ya se han presentado trabajos indicando la necesidad de integrar los modelos matemáticos para obtener predicciones que faciliten el desarrollo experimental del estudio. Se han utilizado diferentes argumentos para defender el uso de estas aplicaciones. Existe una gran dificultad a la hora de distinguir morfológicamente las SSCs *in situ* de otras células. En este sentido, definir funcionalmente una SSC es muy difícil, normalmente los procedimientos conllevan la perturbación de la condición *in vivo*, con lo que se modificaría el comportamiento de la célula inicial (Viswanathan S et al, 2003) (principio de incertidumbre (Loeffler M et al, 2002). Además, determinar el

número de posibles interacciones entre SSCs es extremadamente complejo, haciéndose necesaria una simplificación teórica para comprender las propiedades fundamentales del sistema (*Viswanathan S et al, 2003*).

¿Qué requisitos tiene que tener un modelo aplicado a este caso concreto? Fundamentalmente los requisitos deben de estar de acuerdo con la definición de SSC y el papel de sus componentes, para ello recurrimos a identificar los componentes del modelo ya diseñado para las líneas celulares hematopoyéticas) (*Roeder I et al, 2002*).

- Partimos de una población fluctuante de células individuales (SSCs) que van expandiéndose por clonación a la vez que diferenciándose.
- Se da un comportamiento dinámico en tiempo y espacio en la producción y diferenciación de los espermatozoides.
- En el modelo tienen que implementarse las asunciones que puedan hacerse con respecto a los mecanismos que regulan la proliferación, apoptosis, diferenciación o mantenimiento en el propio nicho.
- Debe ser comprensivo en el sentido de ser aplicable a condiciones tanto de homeostasis *in vivo* como a ensayos *in vivo* o *in vitro* (robustez).

Como ya hemos comentado, existen publicaciones que han desarrollado simulaciones a partir de modelos de auto-organización de las SCs del tejido hematopoyético. En ellos se consigue la organización del sistema a partir del establecimiento de reglas puntuales de comportamiento, como la afinidad de las células por el nicho o los cambios coordinados en el ciclo celular. (*Loeffler M et al, 2002, Roeder I et al, 2002*).

Otros estudios sobre la distribución y diferenciación celular de las SCs del intestino delgado han ofrecido también resultados consistentes al comparar

las predicciones realizadas sobre la localización de las células con los datos experimentales obtenidos. Se sacaron conclusiones que validan la utilidad del modelo, como la posible existencia de un gradiente en la disposición de las células diferenciadas (*Meineke FA et al, 2001*).

Aplicación del modelo para nichos de SCs

Organización tisular de las SCs en el nicho

Los procesos de autorenovación, diferenciación y proliferación no pueden entenderse como destinos celulares predeterminados, jerarquizados y unidireccionales. Cada célula se va desarrollando con una propensión dinámica y variable. El cambio de características que va sufriendo un linaje celular hay que entenderlo como un continuo, que alterará las propiedades de estos procesos (*Roeder I et al, 2002*).

Dependencia del ambiente sobre el desarrollo celular.

El estado y desarrollo de un linaje celular depende de las condiciones de interacción entre las células, no es lineal en el tiempo como tradicionalmente se pensaba. La transición entre ambientes diferentes es lo que provocará fluctuaciones en la expresión y desarrollo de la funcionalidad celular. Como hemos comentado con anterioridad, hay que asumir una flexibilidad en la adquisición de las propiedades estado-estacionarias para comprender la organización del sistema celular en el que se desarrollan las SSCs. Existen, al menos en teoría, tres puntos que deben controlarse para que se mantenga la identidad del sistema (Figuras 12 y 13):

- El **rango de propiedades fenotípicas** de cada SSC en la etapa de diferenciación.

- **Plasticidad de respuesta** a los cambios, al variar de microambientes: intersticio/pared túbulo seminífero y compartimento basal/zona adluminal.
- Las **variaciones** durante las transiciones entre ambientes.

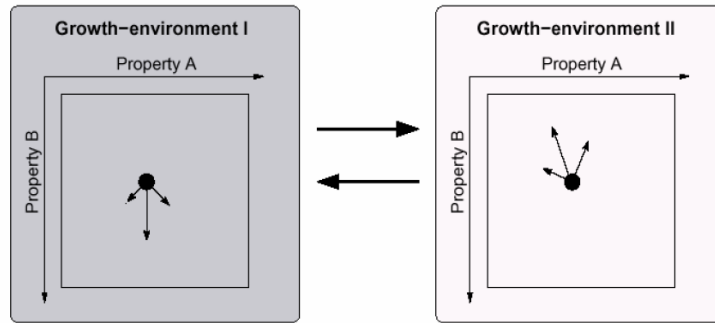


Figura 12. Rango de propiedades desarrolladas por una misma célula en distintos ambientes de crecimiento

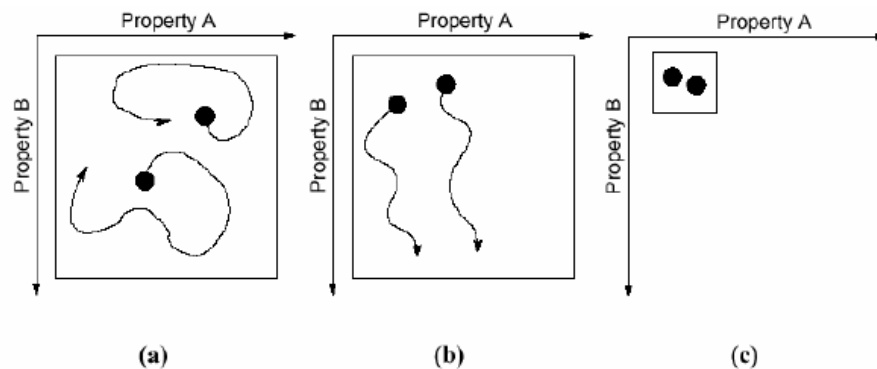


Figura 13. Desarrollo celular con respecto a las propiedades A y B. Se muestran las posibles trayectorias de dos células. En (a) fluctuarían de forma reversible en un amplio rango de opciones. En (b) este proceso sería no reversible para la propiedad B y por lo tanto el desarrollo potencial estaría restringido. En (c) se representa el desarrollo potencial mínimo. (Roeder I et al, 2002).

5.1. Diferenciación

El grado de determinación o la aleatoriedad subyacente en el establecimiento de cada linaje celular derivado de las SCs ha sido controvertido (Roeder I et al, 2002). Un creciente número de artículos apoyan la influencia de elementos estocásticos sobre los fenómenos de reversibilidad de la restricción

génica como elementos indispensables que intervienen en el establecimiento de un linaje celular (figura 14). De esta forma consiguieron resultados coherentes con las observaciones experimentales previas. (Theise ND et al, 2002)(Theise ND, 2002).

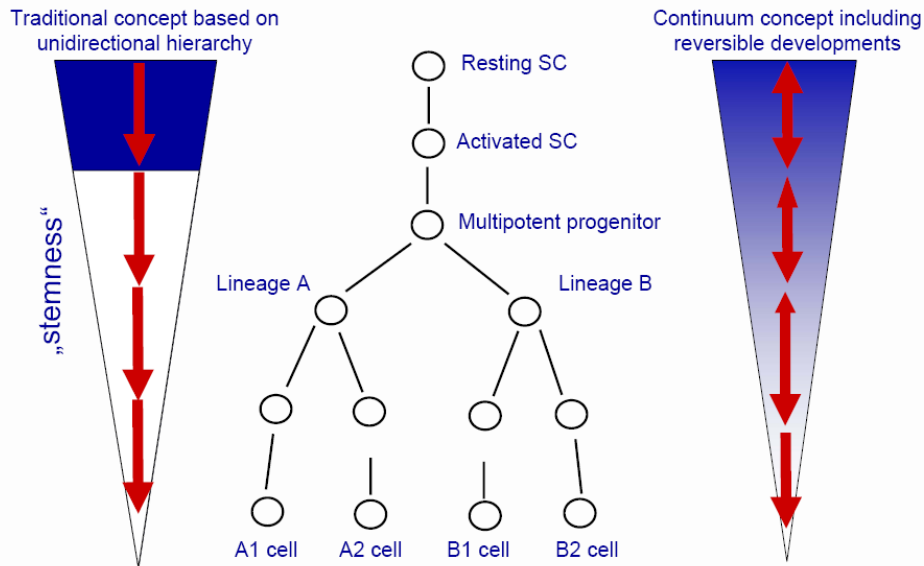


Figura 14. Concepto tradicional de la jerarquía unidireccional frente al concepto de continuidad y reversibilidad (Glauche I et al, 2007).

Se debe de entender un ambiente de competencia entre los factores de expresión y asumir que la diferenciación hacia espermatogonias más diferenciadas se dará, cuando:

- Todos los factores implicados que codifican hacia la ruta de diferenciación de las SSCs, estén expresándose adecuadamente en el tiempo (figura 15).

En etapas tempranas existirá un mayor grado de co-expresión de factores antagónicos de diferenciación/indiferenciación (como *Sohlh1* y *Ngn3*).

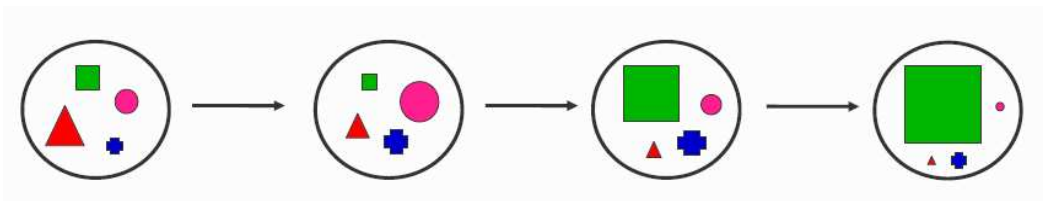


Figura 15. Abundancia relativa de los distintos factores durante la etapa de diferenciación celular. El cuadrado verde representa al global de factores específicos de un linaje celular (Glauche I et al, 2007).

- Los complejos de interacción se comprometan en dos regímenes de control antagónicos (figura 16). Se especula con un mecanismo molecular en el que todos los componentes se ciñan a un orden de progresión hacia la diferenciación (Roeder *l et al*, 2002). En el caso del nicho de SSCs se conocen localizaciones en las que se propicia una condición represiva (intersticios) y aquellas que favorecen la diferenciación (zonas de contacto entre túbulos seminíferos).

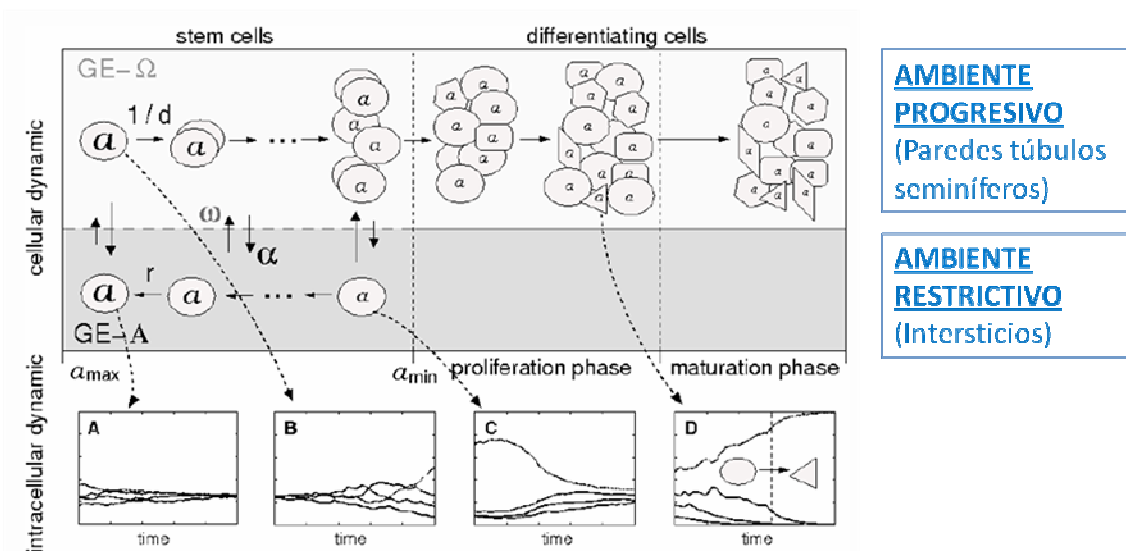


Figura 16. Dinámica celular e intracelular (factores de transcripción) durante los procesos de autorrenovación, proliferación y diferenciación (Glauche *l et al*, 2007).

Las SSCs recorren diferentes microambientes conforme progresan en su diferenciación. Yoshida y cols. mostraron una disposición inicialmente cercana a los intersticios y sin embargo una posterior dispersión y proliferación hacia las zonas de contacto entre las paredes de los túbulos seminíferos. Éstas serían las zonas de colonización de las SSCs más diferenciadas, que a su vez van migrando hacia la zona adluminal. La clave está en elaborar modelos experimentales que permitan registrar los datos sobre los cambios que se dan entre los elementos del nicho en cada momento.

5.2. Autorenovación

Sabemos que el potencial de autorenovación se ve irreversiblemente disminuido por procesos epigenéticos durante la diferenciación de las SSCs (figura 17). Sin embargo tenemos constancia de que, aunque en menor medida, existe un proceso de recolonización del nicho por las SSCs que implicaría una posible reversibilidad del proceso de diferenciación, al menos en las etapas menos avanzadas (Nagano MC, 2003).

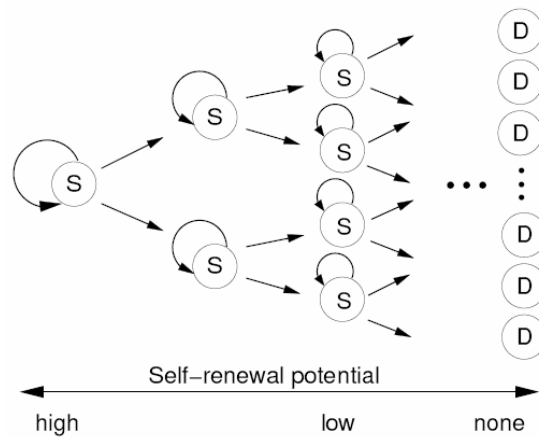


Figura 17. Cambio del potencial de autorenovación de las SCs durante la diferenciación. S: Indiferenciadas y D: Diferenciadas (Glauche I et al, 2007).

El intersticio es la zona donde deben darse los fenómenos necesarios para la autorenovación de las SSCs, es el sitio donde deben identificarse los elementos que interactúan en este proceso y el punto de mira donde observarlo.

Los modelos ya comentados en hematopoyesis incluyeron parámetros estocásticos que condicionan la transición entre el estatus cíclico y el proliferativo. Aunque se conoce menos sobre la condición de estas transiciones en SSCs, sería interesante aplicar los mismos principios y observar el resultado por simulaciones. Si parten de un constructo evolutivo similar, pueden aportar

mayor realidad ya que en los estudios hematopoyéticos se observó una gran correlación con resultados experimentales obtenidos previamente (*Glauche I et al, 2007*).

Podría ser interesante combinar las propuestas experimentales de Nagano con la de elaborar un modelo explicativo de la transición **intersticio-pared túbulo seminífero**. El primero indica la necesidad de caracterizar la eficiencia del homing o recolonización, a través de trasplantes secuenciales de SSCs. Posteriormente sería interesante comparar estos resultados y hacerse una idea del procedimiento para definir los parámetros, que guían el proceso de recolonización o incluso el grado de afinidad de la SSCs para salir del ambiente cíclico de autorenovación.

Pueden desarrollarse modelos basados en el patrón definido ya para el proceso de diferenciación y mediante simulaciones, identificar los procesos que acontecen en el ambiente restrictivo (intersticio) y el proliferativo (zonas de contacto entre paredes de túbulos seminíferos) en las distintas condiciones de estudio que se requieran.

CONCLUSIONES

- La ausencia de marcadores específicos moleculares para las SSCs dificulta su detección y aislamiento.

- Se han descrito algunos componentes del nicho de las SSCs como las células de Sertoli, la membrana basal, las células mioideas peritubulares y las señales externas al túbulo seminífero, que influyen en el comportamiento de las SSCs.
- Se ha relacionado la función de autorenovación para las SSCs con la cara intersticial de la pared del túbulo seminífero (nicho restrictivo,) y la función de proliferación con zonas de contacto entre las paredes de los túbulos adyacentes (nicho permisivo).
- Los estudios realizados en ratón demuestran que el trasplante de SSCs es un tratamiento eficaz para restaurar la fertilidad. Hacen falta más estudios para poder aplicar la técnica en preservación de la fertilidad en humanos.
- El nicho puede ser usado como diana terapéutica. En este sentido, los defectos en el nicho de la línea germinal masculina pueden ser corregidos por trasplante de células de Sertoli.
- El concepto clásico de célula madre aislada y estática se ha quedado obsoleto a la hora de explicar la biología de estas células. Es necesario un contexto sistémico y dinámico, como el nicho, para entender su comportamiento.
- Los modelos computacionales pueden ayudar al estudio de las SCs en el contexto del nicho. Facilitan el planteamiento de hipótesis, predicen o anticipan las consecuencias de manipular el sistema de estudio y permiten identificar un principio común en la construcción de los distintos nichos.

BIBLIOGRAFÍA

Adams GB and Scadden DT: A niche opportunity for stem cell therapeutics. *Gene Ther.*, 2008, 15: 96-99

Anderson DJ: Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. *Neuron*, 2001, 30: 19-35

Avarbock MR, Brinster CJ and Brinster RL: Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat.Med.*, 1996, 2: 693-696

Ballow D *et al*: Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. *Dev.Biol.*, 2006, 294: 161-167

Bellve AR: Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol.*, 1993, 225: 84-113

Brinster RL: Male germline stem cells: from mice to men. *Science*, 2007, 316: 404-405

Brinster RL and Avarbock MR: Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1994a, 91: 11303-11307

Brinster RL and Zimmermann JW: Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1994b, 91: 11298-11302

Buaas FW *et al*: Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat.Genet.*, 2004, 36: 647-652

Chen C *et al*: ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*, 2005, 436: 1030-1034

Chiarini-Garcia H, Raymer AM and Russell LD: Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*, 2003, 126: 669-680

Dadoune JP: New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem.Cytobiol.*, 2007, 45: 141-147

de Rooij DG and Russell LD: All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J.Androl.*, 2000, 21: 776-798

de Rooij DG and Grootegoed JA: Spermatogonial stem cells. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 1998, 10: 694-701

DEL CASTILLO EB, TRABUCCO A and ONATIVIA A: A syndrome of testicular insufficiency characterized by the complete absence of Leydig cells,

disturbance of germinal epithelium and decreased urinary gonadotrophins. *Acta Endocrinol.(Copenh)*, 1953, 12: 8-22

Dobrinski I *et al*: Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice. *Mol.Reprod.Dev.*, 1999, 53: 142-148

Ebata KT, Zhang X and Nagano MC: Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development. *Mol.Reprod.Dev.*, 2005, 72: 171-181

Ellen G and Herman T: Is there a clinical future for spermatogonial stem cells? *Curr.Stem Cell.Res.Ther.*, 2007, 2: 189-195

Falender AE *et al*: Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev.*, 2005, 19: 794-803

Feng LX *et al*: Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science*, 2002, 297: 392-395

Freiman RN *et al*: Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development. *Science*, 2001, 293: 2084-2087

Fuchs E, Tumber T and Guasch G: Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 2004, 116: 769-778

Gargett CE: Review article: stem cells in human reproduction. *Reprod.Sci.*, 2007, 14: 405-424

Garrido N & Meseguer M., Bancos de semen, *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. Remohí J *et al.*, Madrid, McGraw-Hill, 2008, 47-51.

Geens M *et al*: Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application. *Hum.Reprod.Update*, 2008, 14: 121-130

Geens M *et al*: The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients. *Hum.Reprod.*, 2007, 22: 733-742

Geens M *et al*: Spermatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice. *Hum.Reprod.*, 2006, 21: 390-396

Glauche I *et al*: Lineage specification of hematopoietic stem cells: mathematical modeling and biological implications. *Stem Cells*, 2007, 25: 1791-1799

Goossens E, De Block G and Tournaye H: Computer-assisted motility analysis of spermatozoa obtained after spermatogonial stem cell transplantation in the mouse. *Fertil.Steril.*, 2007,

Hess RA *et al*: Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell.Cycle*, 2006a, 5: 1164-1170

Hess RA *et al*: Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell.Cycle*, 2006b, 5: 1164-1170

Hogan, B., Costantini, F. & Lacy, L. Manipulating the mouse embryo — A laboratory manual (second ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. (1994).

Jones DL and Wagers AJ: No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2008, 9: 11-21

Kanatsu-Shinohara M *et al*: Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum.Reprod.*, 2005a, 20: 2376-2382

Kanatsu-Shinohara M *et al*: Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*, 2005b, 132: 4155-4163

Kanatsu-Shinohara M *et al*: Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum.Reprod.*, 2003, 18: 2660-2667

Katayama Y *et al*: Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 2006, 124: 407-421

Kubota Y *et al*: Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J.Cell Biol.*, 1988, 107: 1589-1598

Kvist K *et al*: Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum.Reprod.*, 2006, 21: 484-491

Loeffler M and Roeder I: Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach. *Cells Tissues Organs*, 2002, 171: 8-26

Meineke FA, Potten CS and Loeffler M: Cell migration and organization in the intestinal crypt using a lattice-free model. *Cell Prolif.*, 2001, 34: 253-266

Meng X *et al*: Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 2000, 287: 1489-1493

Nagano MC: Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. *Biol.Reprod.*, 2003, 69: 701-707

Nayernia K: Stem cells derived from testis show promise for treating a wide variety of medical conditions. *Cell Res.*, 2007, 17: 895-897

Oatley JM *et al*: Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2006, 103: 9524-9529

Ogawa T, Ohmura M and Ohbo K: The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int.J.Hematol.*, 2005, 82: 381-388

Ohta H, Tohda A and Nishimune Y: Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells in the w/wv mutant mouse testis. *Biol.Reprod.*, 2003, 69: 1815-1821

Olive V and Cuzin F: The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 2005, 37: 246-250

Raff M: Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 2003, 19: 1-22

Roeder I and Loeffler M: A novel dynamic model of hematopoietic stem cell organization based on the concept of within-tissue plasticity. *Exp.Hematol.*, 2002, 30: 853-861

Schlatt S *et al*: Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Hum.Reprod.*, 2002, 17: 55-62

Seandel M *et al*: Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature*, 2007, 449: 346-350

Shinohara T *et al*: Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2001, 98: 6186-6191

Shinohara T *et al*: Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2000, 97: 8346-8351

Shinohara T, Avarbock MR and Brinster RL: Beta1- and Alpha6-Integrin are Surface Markers on Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1999, 96: 5504-5509

Spradling A, Drummond-Barbosa D and Kai T: Stem cells find their niche. *Nature*, 2001, 414: 98-104

Tegelenbosch RA and de Rooij DG: A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat.Res.*, 1993, 290: 193-200

Theise ND: New principles of cell plasticity. *C.R.Biol.*, 2002, 325: 1039-1043

Theise ND and Krause DS: Toward a new paradigm of cell plasticity. *Leukemia*, 2002, 16: 542-548

Viswanathan S and Zandstra PW: Towards predictive models of stem cell fate. *Cytotechnology*, 2003, 41: 75

Wilson A and Trumpp A: Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat.Rev.Immunol.*, 2006, 6: 93-106

Yamashita YM, Jones DL and Fuller MT: Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science*, 2003, 301: 1547-1550

Yomogida K *et al*: Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol.Reprod.*, 2003, 69: 1303-1307

Yoshida S, Sukeno M and Nabeshima Y: A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*, 2007, 317: 1722-1726

Zhang Z, Shao S and Meistrich ML: The radiation-induced block in spermatogonial differentiation is due to damage to the somatic environment, not the germ cells. *J.Cell.Physiol.*, 2007, 211: 149-158