

Universidad Ricardo Palma  
Vice Rectorado Académico  
Centro de Investigación

Programa Anual de Investigación 2015

### INFORME FINAL

1. Título Aislamiento y cultivo in vitro de células madre espermatozonales de testículos de *Canis lupus familiaris*

2. Responsable: Hugo Gonzales Figueroa

Colaborador: Anderson Oropeza Clavo

3. Período de ejecución: febrero-diciembre 2015

#### 4. Objetivo Central del Estudio

En el presente trabajo se han aislado y mantenido en cultivo espermatozonias (SSC) de testículos de individuos castrados de *Canis lupus familiaris* utilizando dos métodos, uno enzimático (colagenasa tipo IV, hialuronidasa, tripsina) y otro no enzimático (disgregación mecánica con jeringa) y filtración millipore.

5. Concordancia con los lineamientos de política de investigación del CIURP

R1: Práctica social ( ) R2: Diversidad cultural ( )

R3: Biodiversidad (X) R4: Información ( )

R5: Capacitación ( ) R6: Gestión ( )

R7: Líneas perspectivas ( )

## 6. Tipo de Investigación

Descriptiva ( ) Experimental (X) Bibliográfica ( )

Documental ( ) Histórica ( ) Otras ( )

## 7. Estado actual

No ejecutado ( ) Suspendido ( ) En proceso ( )

Concluido sin inf. fin ( ) Concluido inf. fin (X) Publicado ( )

## 8. Principales conclusiones

Las SSC comprenden solo el 3% de la población celular germinal en los testículos adultos.

Las células aisladas por el método no enzimático son aquellas que generan mayor número de colonias, pero que no resisten a más de 3 pases.

Las células aisladas por el método enzimático, resisten hasta 7 pases pero no generan muchas colonias

## 9. Logros importantes:

El presente trabajo permitió el entrenamiento integral en actividades de investigación experimental del estudiante Anderson Oropeza Clavo

La preservación por tiempo prolongado de las SSCs es fiable al ofrecer la posibilidad de restituir en los sistemas de reparto in vivo, tras la evaluación y selección de los genotipos de mejor calidad.

## 10. Resumen del balance económico

Se presentó en su oportunidad la rendición de cuenta documentada sobre el total del apoyo económico recibido

Aislamiento y cultivo *in vitro* de células madre espermatogoniales de testículos  
de *Canis lupus familiaris*

Gonzales Figueroa Hugo & Oropeza Clavo Anderson

Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas.

Universidad Ricardo Palma

Resumen:

La espermatogénesis es un proceso por el cual se producen espermatozoides a partir de células madre en los testículos. En los mamíferos existe una continua producción de espermatozoides durante toda la vida del individuo por una población de células madre espermatogoniales (Spermatogonial Stem Cells – SSC). Las SSC comprenden solo el 3% de la población celular germinal en los testículos adultos. El presente estudio investigó las mejores condiciones para aislar y mantener en cultivo *in vitro* las SSC por tiempo prolongado, utilizando dos métodos, uno enzimático (colagenasa tipo IV, hialuronidasa, tripsina) y otro no enzimático (disgregación mecánica con jeringa). Se obtuvo un rendimiento del 93% para ambos métodos, y mediante el uso de la T de Student no se detectaron diferencias significativas entre los métodos de aislamiento ( $0.05 < p$ ). Se observó que aquellas células aisladas por el método no enzimático son aquellas que generan mayor número de colonias, pero que no resisten a más de 3 pases; en contraste con lo que se observa con las células aisladas por el método enzimático, que resisten hasta 7 pases pero que no generan muchas colonias. Esta última característica permite el cultivo por tiempo prolongado de las SSC, por lo que es recomendable continuar investigando en esta línea.

Palabras clave: Células madre espermatogoniales, SSC, *in vitro*, cultivo, enzimático.

#### Abstract:

Spermatogenesis is a process by which sperm are produced from stem cells in the testes. In mammals there is a continuous production of spermatozoa throughout the life of the individual from a population of spermatogonial stem cells (Stem Cells spermatogonial - SSC). The SSC comprise only 3% of the germ cell population in the adult testis. The present study investigated the best conditions for isolating and maintaining in culture in vitro for prolonged periods SSCs using two methods, one enzyme (type IV collagenase, hyaluronidase, trypsin) and other nonenzymatic (mechanical disruption syringe). A yield of 93% was obtained for both methods, and by using the Student t no significant difference between the methods of isolation ( $0.05 < p$ ) were detected. It was observed that those cells isolated by nonenzymatic method are those that generate higher number of colonies, but not resist more than 3 passes; in contrast to what is observed with cells isolated by the enzymatic method, which resist to 7 passes but do not generate many colonies. This latter feature allows the cultivation of the SSC prolonged time, so it is advisable to continue research on this line.

Keywords: Spermatogonial stem cells, SSC, *in vitro*, culture, enzymatic.

#### Introducción:

La espermatogénesis es un proceso por el cual se producen espermatozoides a partir de células madre en los testículos. En los mamíferos existe una continua producción de espermatozoides durante toda la vida del individuo por una población de células madre espermatogoniales (Spermatogonial Stem Cells – SSC). Esta subpoblación de células de espermatogonias de tipo A, de tamaño pequeño y con capacidad de auto-renovarse, se encuentra en el compartimiento basal de los túbulos seminíferos (Huckins, 1971; Rooij, 2015) y son las que inician la espermatogénesis a través de un equilibrio entre la auto-renovación y diferenciación celular en los testículos adultos de mamíferos (Hoffman, 2008; Phillips, Gassei y Orwig, 2010).

Las espermatogonias son células madre unipotentes que pueden originar un solo linaje celular, es decir, que en última instancia, van a producir espermatozoides. Estas por su

capacidad de auto-renovarse, pueden restituir la espermatogénesis cuando se trasplantan en los túbulos seminíferos de un individuo infértil (Brinter y Zimmermann, 1994; Ogawa 1997; Izadyar 2000; Russell 2000; Schlatt 2002; Fujita 2005; Khaira 2005).

Hasta el momento no se ha dilucidado completamente la identidad de este tipo de células madre en los testículos, por lo que se han propuesto al menos dos modelos para describir su renovación y/o diferenciación. Un modelo propone que las SSCs se denominen espermatogonias  $A_{\text{single}}$  ( $A_s$ ) (Oakberg, 1971), las que pueden renovarse o diferenciarse en espermatogonias  $A_{\text{pareadas}}$  ( $A_{pr}$ ) que permanecen conectadas por un puente intercelular. Estas espermatogonias luego se dividen y dan lugar a espermatogonias alineadas ( $A_{\text{aligned}}$ ), las que originan más células germinales diferenciadas como las espermatogonias  $A_1 - A_4$ , espermatogonias tipo B y espermatocitos, que inician la meiosis para su posterior diferenciación en espermatozoide. Las espermatogonias  $A_{\text{single}}$ ,  $A_{\text{paired}}$  y  $A_{\text{aligned}}$  a veces son llamadas como espermatogonias indiferenciadas (De Rooij 2000). Otro modelo, planteado por Clermont y Bustos-Obregon en 1968, señala que todas las espermatogonias citadas anteriormente se denominan espermatogonias  $A_0$ . Se asume que estas células permanecen quiescentes o se dividen muy lentamente, a menos que una pérdida excesiva de células germinales estimule su proliferación, como una lesión o irradiación (Clermont y Hermo, 1975). El primer modelo es el que se acepta hasta el momento, pues las espermatogonias  $A_1 - A_4$  mantienen su potencia (pues son células madre comprometidas), así, una espermatogonia  $A_4$  puede originar una nueva  $A_1$  o avanzar en el proceso de diferenciación a través de la espermatogénesis.

Las SSCs expresan altamente las integrinas  $\alpha$ -6 y  $\beta$ -1 (Shinohara 1999; Barros, Worst 2012) y no expresa el receptor c-kit (Ohta 2000). Recientemente se ha encontrado en ratones transgénicos la sobreexpresión del Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), aumentando la proliferación de grupos indiferenciados de espermatogonias  $A$ , que contienen principalmente, pero no exclusivamente  $A_{\text{single}}$  (Rooij 2000; Buageaw 2005; Hoffmann 2005; Hofmann, 2008; Schmidt 2009). Estas células también pueden originar tumores testiculares que asemejan un semioma humano (Tadokoro 2002; Singh 2011). Se

ha demostrado que un subconjunto de espermatogonias tipo A expresan los receptores para GDNF (Dettin 2003; Von Schonfeldt 2004).

La identificación y el aislamiento de las SSCs son fundamentalmente para la comprensión de la regulación y el crecimiento durante los primeros pasos de la espermatogénesis, así como su comportamiento en el restablecimiento de la fertilidad en testículos con deficiente producción de espermatozoides. Estas células, en la actualidad continúan mal caracterizadas, por la escasez de marcadores moleculares específicos que nos permitan distinguirlos de otras células germinales (Hofmann 2005; Hermann 2011; Costa 2012; Bellaiche 2014), para así elaborar nuevas tecnologías de terapia celular para el tratamiento de la infertilidad en el macho.

Las últimas investigaciones en el campo de la biología molecular y células de cultivos *in vitro* de células madre espermatogoniales (SSCs) ha abierto nuevas posibilidades en la reproducción asistida en machos. Las técnicas asocian la recolección y el cultivo *in vitro* de las SSCs para luego trasplantarlas a los testículos de los machos receptores previamente despojados de sus células madre mediante métodos farmacológicos. La preservación por tiempo prolongado de las SSCs es fiable al ofrecer la posibilidad de restituir en los sistemas de reparto *in vivo*, tras la evaluación y selección de los genotipos de mejor calidad.

Es por esto que existen numerosos métodos para el aislamiento de las SSC, tales como chapado diferencial, sedimentación por velocidad, elutriación, gradiente discontinuo, Hoechst 33342 y rodamina 123, las células magnéticas activadas por la clasificación (MACS) y células activada por fluorescencia (FACS) para aislar SSC en diferentes especies, los cuales hasta el momento son ineficientes por la falta de marcadores de superficie celular de las SSC y de los anticuerpo necesarios para su identificación (van Pelt 1996; Shinohara 2000; Luo 2006; Rodriguez-Sosa 2006).

En el presente trabajo se utilizaron dos técnicas para aislar y cultivar espermatogonias de testículos de perro *in vitro*. Las células aisladas por el método no enzimático son las que generan un mayor número de colonias, pero que no resisten a más de 3 pases; en

contraste con las células aisladas por el método enzimático, que resisten hasta 7 pases pero que no generan muchas colonias.

## Materiales y Métodos

### Obtención de las SSCs

Los testículos se obtuvieron de individuos castrados en el camal y fueron transportados en solución salina al laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma. Nosotros trabajamos con tres pares de testículos, utilizando medio la mitad de cada par para cada método.

### Aislamiento de las SSCs

Llegadas las muestras al laboratorio, se lavaron tres veces con medio Dulbecco libre de calcio y fosfato tamponada con magnesio (DPBS; GibcoBRL).

### Método enzimático

El tejido se incubó a 37°C con colagenasa (1mg/mL, Tipo IV) durante 15 min seguido de hialuronidasa (1mg/ml) durante 10 min. Posteriormente se lavó dos veces con medio DMEM suplementado con 0.25% (w/v) de tripsina y 1 mM EDTA (GibcoBRL) durante 5 min a 37°C. Las células dispersadas fueron lavadas dos veces más con DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS; GibcoBRL) para detener la digestión enzimática y se filtraron con mayas de 70  $\mu$  y 40  $\mu$  para eliminar las células mioideas y de Sertoli. Luego se incubaron las células durante la noche a 37°C en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS con una saturación de 5% de CO<sub>2</sub>.

### Método no enzimático

Las células de los túbulos seminíferos se disociaron mediante pipeteo repetido a través de una jeringa hipodérmica 10 ml equipada con una aguja 22G. Luego las células se filtraron con mayas de 70  $\mu$  y 40  $\mu$  para eliminar las células mioideas y de Sertoli. Luego se incubaron las células durante la noche a 37°C en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS con una saturación de 5% de CO<sub>2</sub>.

Finalmente las células que se adhirieron al fondo del flask se utilizaron para su posterior cultivo. La evaluación de la viabilidad celular se determinó mediante la mezcla de las muestras 1: 1 con 0,4% de azul de tripan y se realizó el conteo en cámara de Neubauer.

Enriquecimiento de SSC se llevó a cabo ya sea por gradiente de densidad Percoll discontinuo (van Pelt et al., 1996). Se obtuvieron 2 ml de suspensión celular que contiene  $\sim 1 \times 10^7$  células se estratificaron en la parte superior de 15, 30, 45, y 60% de Percoll y se centrifugaron a 800 rpm durante 30 min. Las células situadas en la interfase se lavaron dos veces con DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS. Después de 16 h de incubación, se recogieron las células flotantes para su posterior cultivo.

#### Cultivo *in vitro* de las SSCs

El cultivo *in vitro* se realizó en medio DMEM (Gibco BRL) suplementado con 15% (v/v) de FBS, 1% penicilina estreptomycin (Gibco BRL), 1% de L-glutamina, 2 mM 2-mercaptoetanol, 1% de ácidos no esenciales aminoácidos, 1.000 U de factor inhibidor de la leucemia (LIF), y factor de 10 ng/mL GDNF. El medio de cultivo se renovó diariamente. Después de 6 a 7 días de cultivo, las colonias derivadas de SSC fueron tratadas brevemente con 0,05% (w/v) EDTA.

#### Actividad de la fosfatasa alcalina

Para evaluar la actividad de la fosfatasa alcalina de las SSC se fijaron las células con formaldehído al 4% y se tiñeron histoquímicamente. La actividad de la fosfatasa alcalina se evaluó mediante análisis visual de las células teñidas (Ju et al., 2008).

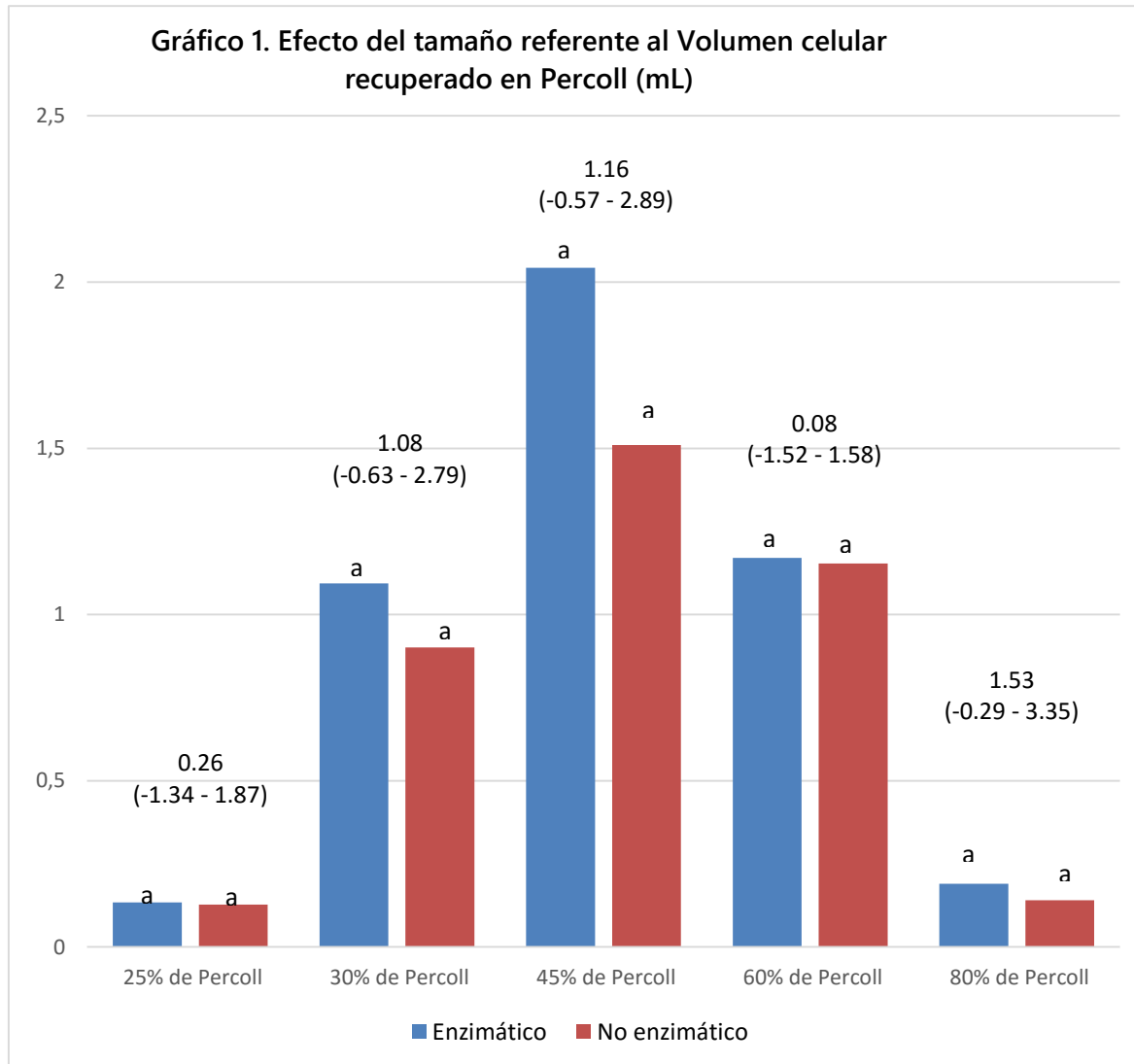
## Resultados y Discusión

Las SSC comprenden solo el 3% de la población celular germinal en los testículos adultos, es por esto que su aislamiento es uno de los retos principales que enfrenta la biología de la reproducción en la actualidad. En la presente investigación no realizamos distinción etaria entre los individuos donantes.

Obtuvimos un 63% y 28% de las SSC en las capas con 45-60% y 30-45% de Percoll respectivamente, la diferencia las encontramos en las otras capas que además contenían células somáticas, por lo que decidimos descartarlas. A las células que recuperamos en las fracciones de 45-60% y 30-45% de Percoll se evaluó la viabilidad con azul de Tripán y la



actividad de la fosfatasa alcalina; en ambos casos las células respondieron positivamente, en más de un 93% para ambos métodos y mediante el uso de la T de Student no se detectaron diferencias significativas entre los métodos de aislamiento ( $0.05 < p$ ), lo cual coincide con los resultados obtenidos con Su Young et al 2009. Se calculó también el efecto del tamaño en las diferentes capas de Percoll para el volumen celular recuperado (Gráfico 1).



**a: No existe diferencias significativas. (.): intervalo de confianza.**

Durante el cultivo *in vitro* se observó el comportamiento de las células, de lo cual podemos rescatar que durante 2-5 días, las células aisladas ya sea individualmente como en grupo, mantienen su viabilidad, mientras que aquellas que se encuentran

contaminadas con otro tipo celular (por ejemplo células de Sertoli), mueren deliberadamente luego del tiempo señalado. Sin embargo, aquellas células somáticas que superen aquel tiempo se diferencian o toman aspecto de fibroblastos hacia el día 7.

Luego de 10 días de cultivo, las SSC tienen cerca de 3 colonias, las cuales podrían ser subcultivadas hasta en 8 pases, con un tiempo de replicación de 6-7 días, dependiendo del tipo de método de aislamiento empleado (un pase es un subcultivo realizado a partir del cultivo anterior, así, cada pase se origina de un cultivo previo, y al realizar un pase se reestablece el ciclo reproductivo celular; es por esto que en los gráficos de crecimiento celular se observan las líneas en paralelo). Esto quiere decir, que por ejemplo aquellas células aisladas por el método no enzimático son las que mayor número de colonias generan, pero las que menor número de pases resisten (máximo 3), impidiendo el mantenimiento por tiempo prolongado de la línea celular espermatogonial (Gráficos2-4).

Gráfico 2. Crecimiento de las SSC's aisladas del individuo 1 por método no enzimático. Se observan en paralelo los pases (subcultivos) realizados.

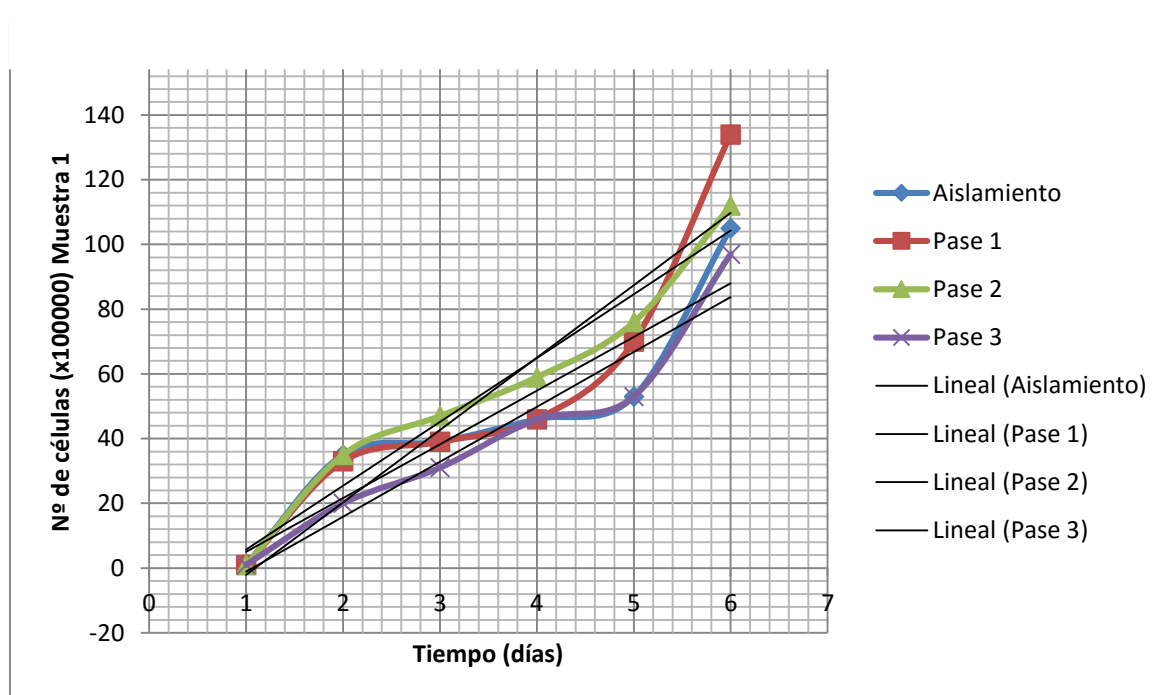


Gráfico 3. Crecimiento de las SSC's aisladas del individuo 2 por método no enzimático. Se observan en paralelo los pases (subcultivos) realizados.

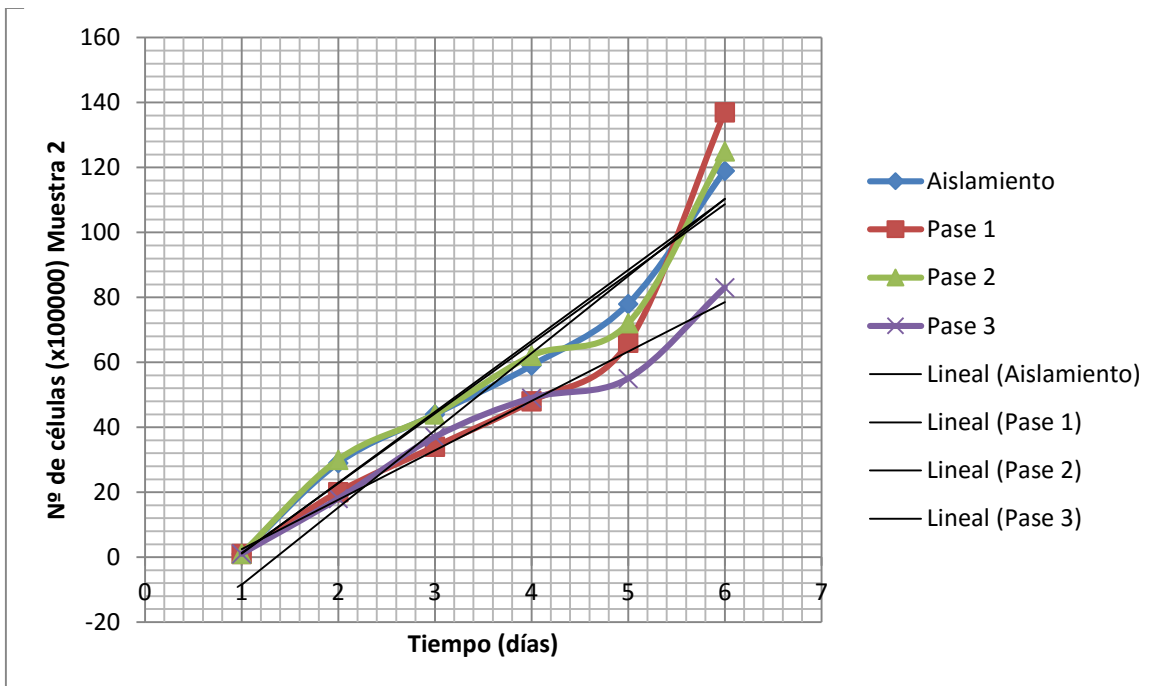
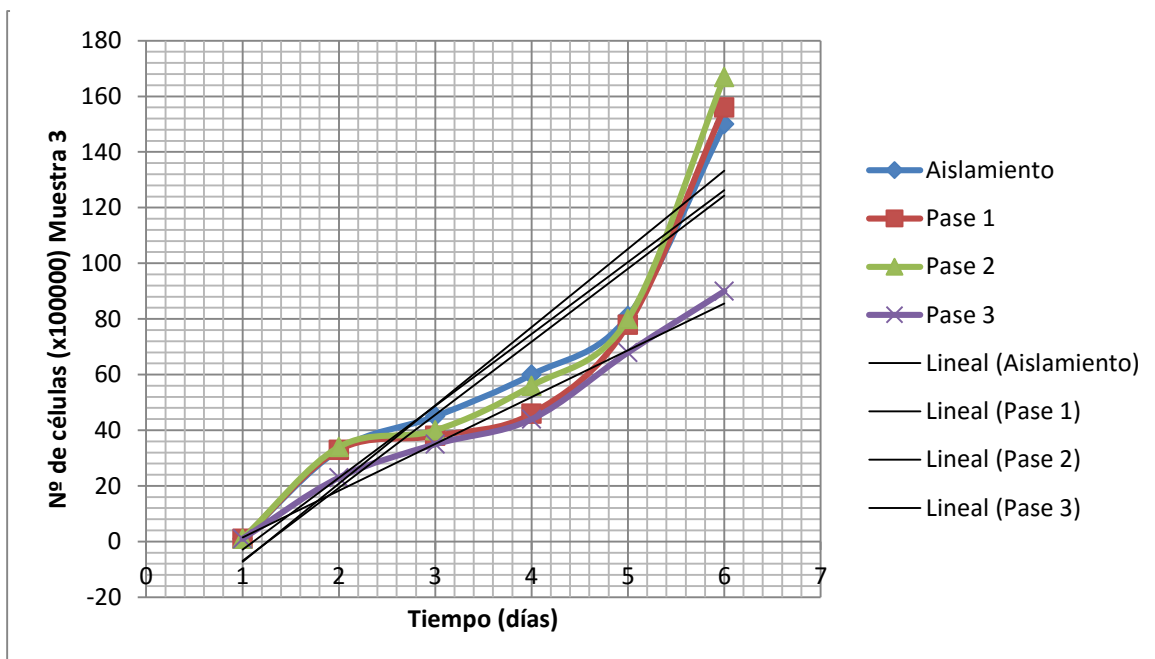


Gráfico 4. Crecimiento de las SSC's aisladas del individuo 3 por método no enzimático. Se observan en paralelo los pases (subcultivos) realizados.



En contraste, aquellas células aisladas por el método enzimático si bien dan menor número de colonias, resisten más del doble de pases que las células aisladas sin el uso de enzimas (Gráficos 5-7). Este dato es vital, pues gracias a esta característica por el método enzimático podemos realizar sub-cultivos continuos y mantener la línea celular espermatogonial por tiempo prolongado, lo cual sería útil si estas células son de individuos genéticamente seleccionados para el reparto en individuos receptores, y así asegurar el mantenimiento de la mejor genética en la descendencia.

Gráfico 5. Crecimiento de las SSC's aisladas del individuo 1 por método enzimático. Se observan en paralelo los pases (subcultivos) realizados.

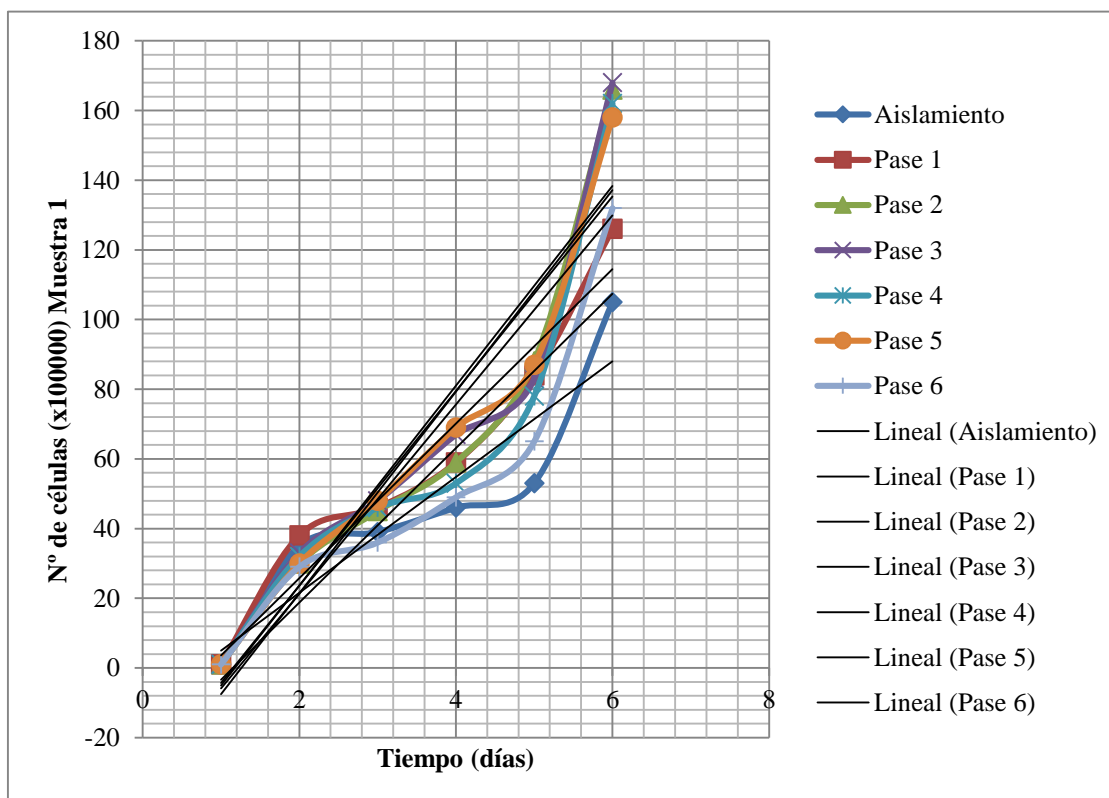


Gráfico 6. Crecimiento de las SSC's aisladas del individuo 2 por método enzimático. Se observan en paralelo los pases (subcultivos) realizados.

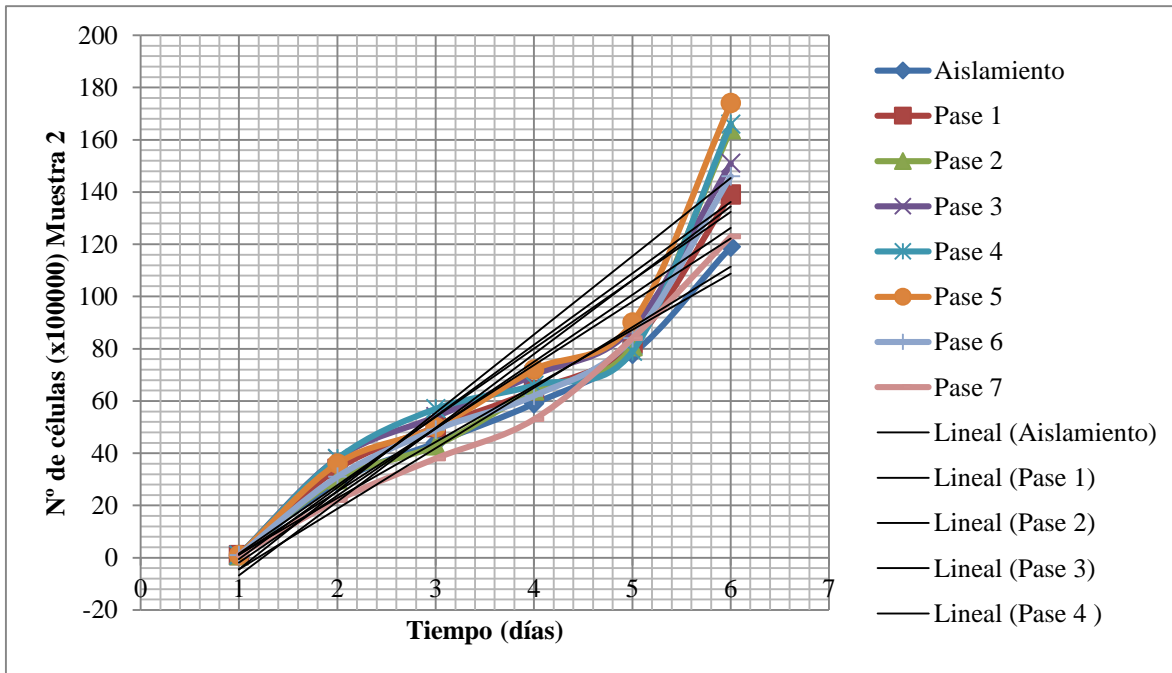
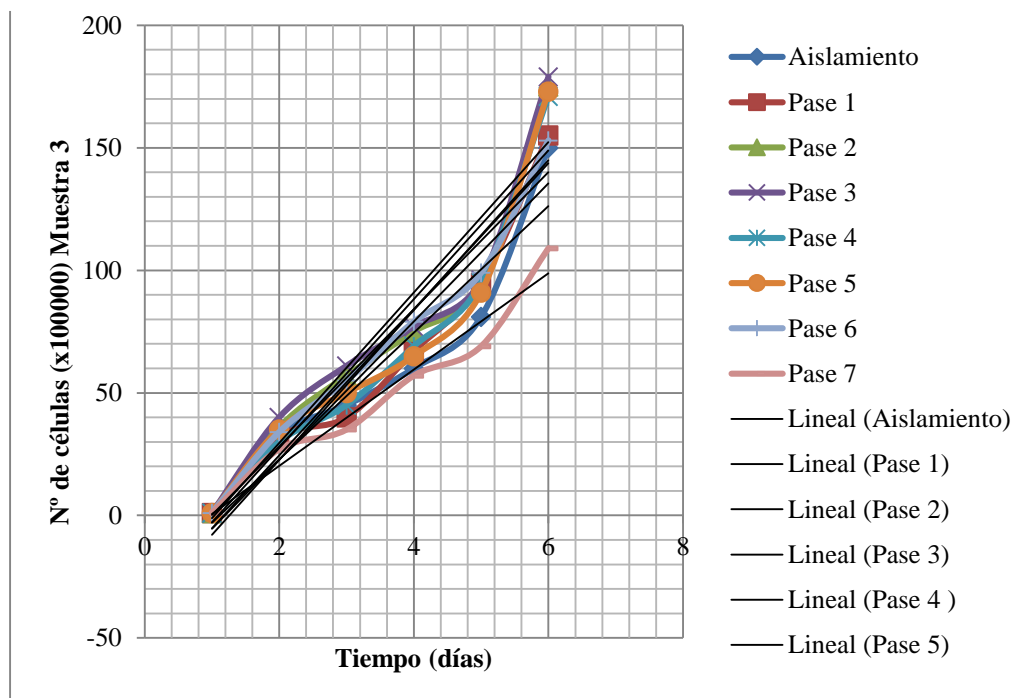


Gráfico 7. Crecimiento de las SSC's aisladas del individuo 3 por método enzimático. Se observan en paralelo los pases (subcultivos) realizados.



Es importante señalar además que en la presente investigación obtuvimos como máximo 7 pases, al final de los cuales las células entraban en senescencia o progresaban en la diferenciación, esto es posible, debido a 2 factores: 1) la falta de regulación hormonal en el cultivo, lo cual genera un desbalance metabólico a nivel celular que por estrés fisiológico genera que la célula progrese en su diferenciación o apoptosis; 2) como no consideramos la edad de los individuos aceptados en la investigación, es probable que este factor sea crucial en el mantenimiento *in vitro* de las SSC.

Los autores recomendamos continuar el estudio de esta línea de investigación y profundizar más en los conocimientos que de esta se desprendan, pues permite el desarrollo de nuevas tecnologías y terapias que pueden ser extrapoladas en sus aplicaciones a seres humanos varones con deficiencias reproductivas en casos como son la azoospermia no obstructiva (ANO); así como en el plano académico, permitiendo el desarrollo de jóvenes investigadores comprometidos con el desarrollo de la ciencia en nuestro país.

#### Referencias Bibliográficas:

1. Barros F, Worst R, Saurin G, Mendes C, Assumpcao M. y Visintin J. 2012.  $\alpha$ -6 Integrin Expression in Bovine Spermatogonial Cells Purified by Discontinuous Percoll Density Gradient. *Reprod Dom Anim* doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.01985.x.
2. Bellaiche J, Lareyre JL, Cauty C, Yano A, Allemand I. y Le Gac F. 2014. Spermatogonial Stem Cell Quest: nanos2, Marker of a Subpopulation of Undifferentiated A Spermatogonia in Trout Testis. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (2014) 90(4):79, 1–14.
3. Brinster R, Zimmermann J. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Sci USA* 1994; 91:11298-11302.
4. Buageaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, Ehmcke J, Rawe V, Pholpramool C, Orwig K. y Schlatt S. 2005. GDNF Family Receptor alpha1 Phenotype of Spermatogonial Stem Cells in Immature Mouse Testes. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 73, 1011–1016 (2005).

5. Clermont Y, Bustos-Obregon E. 1968. Re-examination of Spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous Tubes mounted an "in toto". *Am J Anat* 122:237-247. PubMed:5659131
6. Clermont Y, Hermo L. 1975. Spermatogonial stem cells in the albino rat. *Am J Anat* 142:159-175. PubMed:1115004.
7. Costa G, Avelar G, Rezende-Neto J. y Campos-Junior P, Lacerda S, Andrade B, Thome R, Hofmann M, Franca L. 2012. Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. *PLOS ONE* August 2012 Volume 7 Issue 8 e44091
8. Dettin L, Ravindranath N, Hofmman M. y Dym M. 2003. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. *Biol Rprod* 69: 1565-1571.
9. Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Matsumiya K, Wakayama T, Okuyama A. 2005. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*. Volume 115 Number 7.
10. Hermann B, Phillips B. y Orwig K. 2011. The Elusive Spermatogonial Stem Cell Marker? *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 85, 221–223 (2011)
11. Hoffmann M, Braydich-Stolle L. y Dym M. 2005. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Developmental Biology* 279 (2005) 114– 124.
12. Hoffmann M. 2008. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and Cellular Endocrinology* 288 (2008) 95–103.
13. Huckins C. 1971. The spermatogonial stem cells population in adult rats. I. Their porphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* 169: 533-557. PubMed: 5550532.
14. Izadyar F, Creemers L, van Dissel-Emiliani F, van Pelt A, de Rooij D. 2000. Spermatogonial stem cell transplantation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 169 (2000) 21–26.
15. Ju, J. Y., C. Y. Park, M. K. Gupta, S. J. Uhm, E. C. Paik, Z. Y. Ryoo, Y. H. Cho, K. S. Chung and H. T. Lee. 2008. Establishment of stem cell lines from nuclear transferred and

- parthenogenetically activated mouse oocytes for therapeutic cloning. *Fertil. Steril.* 89(Suppl 5):1314-1323.
16. Khaira H, Mclean D, Ohl D, y Smith G. 2005. Spermatogonial Stem Cell Isolation, Andrology Lab Corner Storage, and Transplantation. *Journal of Andrology*, Vol. 26, No. 4, July/August 2005
  17. Oakberg E. 1971. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec.* 1971;169: 515–531.
  18. Ogawa T, Arechaga J, Avarbock M, y Brinster R. 1997. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 111-122. Ohta H, Yomogida K, Dohmae K. y Nishimune Y. 2000. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* 127:2125-2131.
  19. Phillips B, Kathrin Gassei y Kyle E. Orwig. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2010) 365, 1663–1678.
  20. Rooij D. 2015. The spermatogonial stem cell niche in mammals. *Sertoli Cell Biology* B978-0-12-417047-6.00004-1
  21. Russell L y Griswold M. 2000. Spermatogonial transplantation — an update for the millennium. *Molecular and Cellular Endocrinology* 161 (2000) 117–120.
  22. Schlatt S. 2002. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187 (2002) 107–111.
  23. Schmidt J, Avarbock M, Tobias J. y Brinster R. 2009. Identification of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Regulated Genes Important for Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in the Rat. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 81, 56–66 (2009)
  24. Shinohara T, Avarbock M. y Brinster R. 1999.  $\beta 1$  and  $\alpha 6$  -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 5504–5509, May 1999.
  25. Singh S, Burnicka-Turek O, Chauhan C. y Hou S. 2011. Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 15, No 3, 2011 pp. 468-483



26. Tadokoro Y, Yomogida K, Tohda A. y Nishimue Y. 2002. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the DDNF/FSH pathway. *Mech Dev* 113:29-39. PubMed: 11900972.
27. van Pelt, A. M., A. R. Morena, F. M. van Dissel-Emiliani, C. Boitani, I. C. Gaemers, D. G. de Rooij and M. Stefanini. 1996. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biol. Reprod.* 55:439-444.
28. von Schonfeldt V, Wistuba J. y Schlatt S. 2004. Notch-1, c-kit and GFRalpha-1 are developmentally regulated markers for premeiotic germ cells. *Cytogenet Genome Res* 2004; 105: 235-239. PubMed: 15237212.
29. Suzuki K and Yanagimachi R (1997) Beneficial effect of medium with high concentration serum for direct sperm injection into mouse oocytes using a conventional pipette. *Zygote* 5,111-116.