



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Biología Celular e Histología

Laboratorio de Células Madre, Desarrollo y Cáncer

Tesis Doctoral N° 18

*Interacciones entre las células madre  
pluripotentes del Carcinoma Embrionario  
y las Células Miodes Peritubulares del  
Testículo*

**Pablo Moreno Ruiz**

Licenciado en Ciencias Ambientales y  
Licenciado en Biología por la  
Universidad del País Vasco  
(U.P.V./E.H.U.)

Leioa, 2015



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo dar las gracias, en primer lugar al Profesor Juan Aréchaga Martínez, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y bajo su dirección. Así como al Profesor Jon Arluzea de Jaureguizar por su confianza y apoyo diario con el cual no sólo me ha demostrado que es un gran científico sino una gran persona. Quiero agradecer igualmente a todos mis compañeros del Departamento de Biología Celular e Histología, especialmente a los que han trabajado conmigo en el Laboratorio de Células Madre, Desarrollo y Cáncer: Amaia, Eli, María, Zuriñe y Miguel, por su generosidad e ayuda. Sin olvidarme, por su puesto de Unai Silván, Alejandro Díez y Ricardo Andrade por su inestimable ayuda en el aprendizaje y comprensión de muchas de las técnicas empleadas y resultados obtenidos en este trabajo. Mi agradecimiento igualmente a todos los profesores, técnicos y administrativos del Departamento con los que he compartido todo este tiempo. Merece especial mención el Profesor Fernando Unda y su grupo, quienes me han permitido utilizar su laboratorio como si fuera uno más.

Finalmente, y no por ello menos importante, mi gratitud hacia mis padres y mi hermana por su apoyo incondicional durante toda mi vida. Muchas gracias a Verónica, mi novia, tú has hecho posible que no pierda la perspectiva, sin tu amor y comprensión no hubiera podido terminar este proyecto.

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado gracias a la financiación recibida a través de proyectos de investigación concedidos por los siguientes organismos oficiales: Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura (Gobierno Vasco), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO-Gobierno de España) y a las Ayudas a los Agentes Científico-Tecnológicos integrados en la Red Vasca de Ciencia, Tecnología e Innovación de Euskadi para la investigación fundamental (SAIOTEK - Gobierno Vasco). El autor de esta Tesis Doctoral ha sido becado por la Fundación Jesús de Gangoiti Barrera (Bilbao).

*A mi padres Pablo y Teresa,  
y a mi hermana Bibiñe.*

## **ÍNDICE**

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>X</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Los Tumores Derivados de Células Germinales.....	1
1.2. Estructura General del Testículo y los Túbulos Seminíferos.....	4
1.3. Vascularización del Testículo y los TGCTs.....	6
1.4. El Nicho Celular de las Espermatogonias y su papel en los TGCTs.....	8
1.5. Las Células Mioides Peritubulares.....	12
1.6. Las Metaloproteasas de Matriz Extracelular (MMPs) y sus Inhibidores Tisulares (TIMPs).....	16
1.7. La Citoquina Proinflamatoria TNF- $\alpha$ .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1. Animales de Experimentación.....	24
3.1.1. Ratones Swiss-Webster.....	24
3.1.2. Ratones de la raza 129P2.....	24
3.2. Cultivos Celulares.....	25
3.2.1. Soluciones y Medios Empleados en los Cultivos.....	25
3.2.2. Líneas Celulares Empleadas.....	26

3.2.2.1. Línea de Células Madre Embrionarias AB1.....	26
3.2.2.2. Línea de Células de Carcinoma Embrionario F9 y P19.....	27
3.2.2.3. Línea Celular de Fibroblastos STO.....	27
3.2.3. Protocolo General de Cultivo Celular.....	27
3.3. Cultivos Primarios de Células Miodes Peritubulares de Testículo de Ratón.....	29
3.3.1. Cultivo Organotípico de Túbulos Seminíferos.....	30
3.3.2. Digestión Enzimática y Adhesión Diferencial.....	31
3.3.2.1. Inmunofluorescencia de $\alpha$ -SMA.....	33
3.3.2.2. Expresión de $\alpha$ -SMA mediante PCR de Célula Única.....	34
3.3.3. Gradiente Diferencial de <i>Percoll</i> .....	34
3.4. Técnicas de Co-Cultivo Celular.....	35
3.4.1. Co-Cultivo Celular en 2D.....	35
3.4.1.1. Co-Cultivo Celular Indirecto.....	35
3.4.1.2. Co-Cultivo Celular Directo.....	36
3.4.2. Co-Cultivo Celular en 3D.....	36
3.5. Ensayo de Migración Celular.....	38
3.6. Citometría de Flujo.....	39
3.6.1. Análisis de las Fases del Ciclo Celular.....	39
3.7. Transfección de Células AB1 con el Plásmido ptdTomato-N1.....	40
3.7.1. El Plásmido ptdTomato-N1.....	40
3.7.2. Transfección mediada por Lisosomas Catiónicos.....	41
3.8. Técnicas Histológicas.....	42

3.8.1. Soluciones Empleadas.....	42
3.8.2. Fijación, Inclusión y Tinción de los Tejidos para Microscopía Óptica.....	42
3.8.3. Cortes Histológicos de Criostato.....	43
3.8.4. Procesamiento de Muestras para Microscopía Electrónica..	44
3.8.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido.....	44
3.8.4.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	44
3.9. Técnicas Histo y Citoquímicas.....	45
3.9.1. Inmunihistoquímica sobre Cortes de Criostato de Material Congelado.....	45
3.9.2. Inmunocitoquímica sobre Cultivos Primarios de Células Mioides Peritubulares.....	46
3.9.3. Cuantificación de la Proliferación Celular mediante Colorimetría.....	47
3.10. Técnicas Bioquímicas.....	48
3.10.1. Extracción, Cuantificación y Retrotranscripción de RNA de los cultivos celulares.....	45
3.10.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	49
3.10.2.1. PCR Convencional.....	50
3.10.2.2. PCR de Célula Única.....	51
3.10.2.3. PCR Cuantitativa (Q-PCR).....	52
3.10.3. Electroforesis de los Productos Amplificados en la PCR Convencional y en la PCR de Célula Única.....	54
3.10.4. Zimografía.....	54
3.10.5. ELISA.....	55



3.10.6. Soluciones Empleadas en las Técnicas Bioquímicas.....	57
3.11. Técnicas Quirúrgicas.....	58
3.11.1. Trasplante Celular en los Túbulos Seminíferos.....	58
3.11.1.1. Preparación de las Agujas y Anestesia del Animal.....	58
3.11.1.2. Preparación de las Células para su Trasplante....	58
3.11.1.3. Microinyección de los Conductillos Eferentes...	59
3.12. Análisis Estadístico y de Imagen.....	60
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
4.1. Efecto de las Células ES y EC sobre la Capacidad de Migración de los Fibroblastos Embrionarios (STO) y sobre los Cultivos de PTCs.....	61
4.1.1. Estudio de la Capacidad de Migración de los Cultivos de Fibroblastos STO y Cultivos de PTCs.....	62
4.1.1.1. Ensayos de Migración con Células STO en presencia de Células ES y EC.....	62
4.1.1.2. Ensayos de Migración con Cultivos Primarios de PTCs tratados con Medios Condicionados por Células EC.....	62
4.1.2. Estudio de la Proliferación Celular de los Fibroblastos STO y del Ciclo Celular de los Cultivos Primarios de PTCs tratados con Medios Condicionados por Células EC.....	64
4.1.2.1. Recuento Celular.....	65
4.1.2.2. Análisis del Ciclo Celular.....	65

4.2. Efecto de las Células EC sobre la Expresión de MMPs y TIMPs en los Cultivos Primarios de PTCs.....	68
4.2.1. Expresión de MMPs y TIMPs mediante la Técnica de PCR Convencional.....	68
4.2.2. Análisis de la Expresión de Gelatinasas mediante la Técnica de PCR Cuantitativa.....	69
4.2.3. Estudio de la Presencia de MMPs en Medios Condicionados por los Cultivos Primarios de PTCs.....	70
4.2.3.1. Zimografía de Geles de Gelatina.....	71
4.2.4. Inmunolocalización de la Gelatinasa MMP-9 en los Cultivos Primarios de PTCs.....	73
4.3. Efecto de la Molécula TNF- $\alpha$ sobre los Cultivos Primarios de PTCs....	74
4.3.1. Ensayos de Migración con Cultivos Primarios de PTCs tratados con TNF- $\alpha$ .....	74
4.3.2. Análisis de la Expresión y Secreción de Gelatinasas en los Cultivos Primarios de PTCs tratados con TNF- $\alpha$ .....	76
4.3.2.1. Estudio de la Expresión de Gelatinasas mediante PCR Cuantitativa.....	76
4.3.2.2. Estudio de la Secreción de Gelatinasas mediante Zimografía.....	77
4.3.2.3. Inmunolocalización de la Gelatinasa MMP-9 en los Cultivos Primarios tratados con TNF- $\alpha$ .....	78
4.3.3. Análisis de la Concentración de TNF- $\alpha$ en los Medios de Cultivo condicionados por PTCs, Células EC y Co-Cultivos.....	79

4.3.4. Inmunolocalización de la Molécula TNF- $\alpha$ en los Cultivos Primarios de PTCs con Células EC.....	80
4.4. Aproximación de las Fases Iniciales de Invasión Tumoral en el Carcinoma Embrionario de Testículo.....	82
4.4.1. Caracterización de la Línea de Células Fluorescente AB1 <sup>tomato</sup> .....	82
4.4.2. Tipos de desarrollo de los TGCTs Experimentales a los 10 días.....	83
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>86</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>98</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>99</b>
<b>8. PUBLICACIONES.....</b>	<b>113</b>

## **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

<b>bFGF</b>	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CAFs</b>	<i>Cancer associated fibroblasts</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CD34</b>	<i>Cluster of differentiation 34</i>
<b>CD90</b>	<i>Cluster of differentiation 90</i>
<b>CIS</b>	<i>Carcinoma in situ</i>
<b>CSF-I</b>	<i>Colony Stimulating Factor-I</i>
<b>Ct</b>	Ciclo umbral o <i>Threshold cycle</i>
<b>DAPI</b>	4', 6'-diamino-2-phenylindole
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMEM</b>	<i>Dubelcco Modified Eagle's Minimal Essential Medium</i>
<b>DMEMc</b>	<i>Dubelcco Modified Eagle's Minimal Essential Medium completo</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNAsa</b>	Deoxyribonucleasa I
<b>DPX</b>	Dibutilfeniltalato Poliestireno Xileno
<b>EC</b>	Carcinoma embrionario
<b>ECACC</b>	<i>European Collection of Animal Cell Cultures</i>
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EDTA</b>	Ácido etildiamina tretraacético
<b>EMT</b>	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
<b>ES</b>	(Células) Madre embrionarias
<b>FALS</b>	<i>Forward angle light scatter</i>
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>FGF2</b>	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
<b>FITC</b>	Isocianato de fluoresceína
<b>GDNF</b>	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
<b>GDPH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>ICAM-I</b>	<i>Intra-cellular adhesion molecule-I</i>

<b>IGF-I</b>	<i>Insuline-like Growth Factor-I</i>
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>ISS</b>	<i>Intensity of side scatter</i>
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>LIF</b>	Factor inhibidor de la leucemia
<b>MC</b>	Medio Condicionado
<b>MCF-7</b>	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
<b>MMP</b>	Metaloproteasa de la matriz
<b>MMLV</b>	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
<b>MSC</b>	<i>Stem Cell Medium</i>
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>mem TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>membrane-integrate Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b>MT-MMP</b>	MMP de membrana
<b>NGF</b>	<i>Neural growth factor</i>
<b>OCT</b>	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGF</b>	<i>Platelet derived growth factor</i>
<b>PE</b>	<b><i>Phycoerythrin</i></b>
<b>PECAM-1</b>	<i>Platlet/Endothelial Adhesion Molecule-1</i>
<b>PGCs</b>	Células germinales primordiales
<b>PMN</b>	Leucocito Polimorfonuclear
<b>PModS</b>	<i>Peritubular factor that Modulates Sertoli cell function</i>
<b>PTCs</b>	Células Mioides Peritubulares
<b>ptd</b>	<i>Plasmid Type D</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAsa</b>	Ribonucleasa
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal

<b>SC</b>	Células Madre
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SEM</b>	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
<b>SIM</b>	<i>Sandos Inbred Mice</i>
<b>S/P</b>	Estreptomicina-Penicilina
<b>SPARC</b>	<i>Secreted protein acidic cysteine-rich</i>
<b>SSC</b>	Células Madre de las Espermatogonias
<b>STO</b>	<i>SIM Thioguanine/Ouabain-resistant</i>
<b>sTNF-<math>\alpha</math></b>	<i>soluble Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b>TACE</b>	<i>TNF alpha converting enzyme</i>
<b>TBE</b>	Tris-borato-EDTA
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline</i>
<b>TEM</b>	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
<b>TCGT</b>	<i>Testicular cell germ tumor</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Tumor growth factor <math>\beta</math></i>
<b>TIMP</b>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusión
<b>TNF-R</b>	<i>Tumor Necrosis Factor-Receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Actina de músculo liso- $\alpha$

## **RESUMEN**



## **RESUMEN**

Los túbulos seminíferos del testículo están constituidos por un lumen central, formado por dos tipos celulares diferentes: las células de Sertoli y las células espermatozógenas que conforman el epitelio seminífero. Este epitelio seminífero se encuentra rodeado por una membrana basal y una pared externa formada por fibras de colágeno, fibroblastos y células mioideas peritubulares (PTCs). Estudios recientes demuestran que las PTCs no solo poseen características y funciones a nivel estructural sino que participan de forma activa a través de la secreción de diferentes factores involucrados en el mantenimiento y la regulación de la homeostasis testicular.

Esta actividad secretora de las PTCs está complejamente regulada, sin embargo, las posibles alteraciones que se den en el microambiente testicular, tales como las producidas por la presencia de tumores derivados de células germinales (TGCTs), podrían ocasionar cambios a nivel fenotípico y a nivel molecular en las PTCs, dando lugar a una transición hacia una población celular reactiva que favorecería el crecimiento, invasión y metástasis de los TGCTs, uno de los tumores con mayor incidencia entre individuos adultos jóvenes en Europa y Estados Unidos.

Para estudiar el efecto de la interacción entre las células del tumor y las PTCs se realizaron co-cultivos de células pluripotentes del teratocarcinoma (células EC) y células madre embrionarias (células ES) con fibroblastos embrionarios STO y con cultivos primarios de células mioideas peritubulares del testículo de ratón (PTCs). Los resultados obtenidos muestran la adquisición por parte de las PTCs de características propias de las miofibroblastos asociados a diferentes tumores. Se observó un incremento en la capacidad de migración y un aumento en la expresión y secreción de la gelatinasa MMP-9 cuando las células PTCs se encontraban en co-cultivo con las células tumorales.

Entre todas las citoquinas y moléculas que derivan de las células tumorales y cuya participación se encuentra descrita en la interacción estroma-tumor. Se eligió al Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) para estudiar su papel en la respuesta reactiva que se observó en los cultivos de PTCs. Los resultados mostraron que esta molécula estaba implicada en la expresión y secreción de la gelatinasa MMP-9. Sin embargo, no se observó un efecto directo sobre la capacidad de migración de las PTCs.

Finalmente se realizó una aproximación *in vivo* mediante el trasplante de células madre embrionarias (células AB1) al interior del túbulo seminífero para profundizar en el estudio de los cambios asociados al estroma testicular durante las primeras etapas en el proceso de invasión, prestando especial atención a la población de células PTCs. La histología de los TGCTs experimentales mostró formas distintas a partir de las cuales las células microinyectadas pueden progresar en el interior del túbulo.

# **INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Los Tumores Derivados de Células Germinales del Testículo.

Los tumores derivados de células germinales del testículo (TGCTs) representan alrededor del 95 % del total de las neoplasias testiculares, siendo el tipo de cáncer más frecuente entre los adolescentes y jóvenes-adultos en Europa y Norte América (Chia *et al.*, 2010). Sin embargo, la incidencia de este tipo de tumor se ha visto aumentada en las últimas décadas (Cooper *et al.*, 2010).

El hecho de que existan tumores de morfología muy similar a las neoplasias de la línea germinal fuera de las gónadas, plantea dudas sobre el origen estrictamente germinal de este tipo de tumores. Aunque el hecho de que estos tumores extragonadales aparezcan a lo largo de la línea media corporal, lugar por donde las células germinales primordiales (PGCs) realizan su recorrido hasta colonizar las gónadas, apoya su origen germinal (Horwich *et al.*, 2006).

La “neoplasia intratubular de células germinales” también conocida como **Carcinoma *in situ* (CIS)** aparece como células germinales intratubulares atípicas localizadas generalmente en fila sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos. Presentan un diámetro mayor que las espermatogonias normales, su núcleo también es mayor con grandes nucléolos. En el citoplasma existe una gran cantidad de glucógeno que se pierde durante los procesos de fijación para las preparaciones histológicas. El CIS es el precursor de todos los tumores de células germinales en adultos, con alguna excepción como el seminoma espermatocítico y algunos tumores germinales infantiles (Rajpert-DeMeyts, 2006).

Se cree que en el momento del nacimiento existen unas pocas células CIS en el interior del túbulo seminífero que permanecen en estado latente hasta que el individuo alcanza la pubertad. Durante esta época, las variaciones hormonales asociadas a la maduración sexual alterarían el microambiente donde el CIS se encuentra y, por lo tanto, este carcinoma comenzaría a proliferar y extenderse colonizando túbulos adyacentes a través de la *rete testis* y sustituyendo gradualmente a las espermatogonias.

Los tumores derivados de células germinales se pueden clasificar en función de su patrón histológico, distinguiéndose los grupos que poseen un único patrón de los que poseen más de uno, (Mostofi & Sobin, 1977). La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se basa en este criterio para dividir los distintos tipos de tumores testiculares (Ver Tabla 1 A y B). Entre estos tumores que poseen sólo un patrón histológico se encuentran los seminomas, seminomas espermatocíticos, carcinoma embrionario (EC), tumores del saco vitelino, poliembrionomas, coriocarcinomas y teratomas. Los tumores con más de un patrón histológico poseen combinaciones de los casos mencionados anteriormente, siendo el más frecuente el coriocarcinoma con otro tipo de tumor, y los teratomas con áreas de carcinoma embrionario, estos últimos son conocidos como los teratocarcinomas (Damjanov, 1993).

**TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES:**

**Tumores con sólo un patrón histológico**

<u>Nombre</u>	<u>Características</u>
<b>Seminoma</b>	Forman masas voluminosas de un solo tipo celular Frecuente (50%) con un pico de incidencia entre los 30 y 40 años.
<b>Seminoma espermatocítico</b>	Neoplasia poco frecuente (1-2%) con una incidencia en individuos de edad avanzada. No presenta asociación con el resto de tumores germinales
<b>Tumor de saco vitelino</b>	Aparece a edades tempranas (3años). Se originan de la diferenciación de células pluripotentes hacia células del saco vitelino
<b>Poliembriona</b>	Organización celular similar a embriones de una o dos semanas de gestación
<b>Coriocarcinoma puro</b>	Variedad agresiva de tumor germinal Constituido por células del trofoblasto
<b>Carcinoma embrionario</b>	Compuesto por células pluripotentes que poseen características similares a las células germinales primordiales y las células madre embrionarias
<b>Teratoma (Maduros, inmaduros o con transformación maligna)</b>	Formado por células con distintos grados de diferenciación en ausencia de carcinoma embrionario. En el 45% de los casos aparece con otras variedades histológicas

**Tabla 1.A:** Clasificación anatomopatológica de la OMS para los tumores testiculares de un solo patrón histológico.

**TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES:****Tumores con más de un patrón histológico**

<u>Nombre</u>	<u>Características</u>
<b>Teratocarcinoma</b>	Combinación de células del carcinoma embrionario y teratoma. Presencia de células de las tres capas germinales.
<b>Coriocarcinoma mixto</b>	Combinación de células del trofoblasto con cualquiera de los otros tipos de tumores germinales.
<b>Otras combinaciones</b>	...

**Tabla 1.B:** Clasificación anatomopatológica de la OMS para los tumores testiculares con más de un patrón histológico.

Muchos son los factores de riesgo que están relacionados con el desarrollo de este tipo de tumores como por ejemplo son los desórdenes en el desarrollo sexual o la predisposición familiar (Richiardi *et al.*, 2007; Greene *et al.*, 2010). Entre los factores genéticos se ha detectado una relación entre la modificación de la banda q27 del cromosoma X y el desarrollo de tumores germinales bilaterales (Looijenga & Oosterhuis, 2004). Otros estudios ponen en manifiesto la gran importancia que tiene el ambiente externo en este tipo de cáncer como puede ser el estilo de vida de los países industrializados, donde la incidencia se encuentra entre 2 y 8 tumores de este tipo al año por cada 100.000 habitantes en países como EEUU y Alemania (Bokenmeyer *et al.*, 1992).

Sin embargo poco se conoce todavía sobre el papel que ejercen las células asociadas al microambiente tumoral donde tiene lugar la progresión y el desarrollo de estos TGCTs. Los diferentes factores secretados por las células tumorales generan una serie de cambios en el estroma que les rodea con el fin de crear un microambiente adecuado para el crecimiento y desarrollo del propio tumor. Este estroma reactivo se ha descrito en la progresión de numerosos tumores, incluyendo el cáncer de mama (Stuelten *et al.*, 2010), colon (De Wever *et al.*, 2010-2014), osteosarcoma (Bonucelli *et al.*, 2014) o próstata (Carstens *et al.*, 2014). Sin embargo, el papel del estroma reactivo en la progresión de los TGCTs todavía no ha sido estudiado (Díez-Torre *et al.*, 2011).

## 1.2. Estructura General del Testículo y los Túbulos Seminíferos.

Cada testículo perteneciente a un individuo adulto está rodeado por una cápsula de tejido conectivo denso irregular conocida como túnica albugínea. Y a continuación de esta capa, se puede diferenciar también una túnica vascular formada por tejido conectivo laxo muy vascularizado. En la parte posterior de la túnica albugínea se localiza el mediastino testicular, del cual irradian tabiques de tejido conectivo que dividen al testículo en unos 250 compartimentos conocidos como lóbulos testiculares y que se encuentran intercomunicados. Cada lóbulo posee de uno a cuatro túbulos seminíferos de terminación ciega y poseen una abundante inervación procedente de la túnica vascular (Fig. 1A). En este espacio intersticial de tejido conectivo entre los túbulos seminíferos se encuentran dispersas pequeñas aglomeraciones de células endocrinas conocidas como las células de Leydig. En este estroma testicular también se localizan otras poblaciones celulares como por ejemplo fibroblastos, infiltraciones de leucocitos, linfocitos, macrófagos, capilares sanguíneos y sinusoides linfáticos.

Los túbulos seminíferos del testículo poseen un diámetro de entre 30 y 70  $\mu\text{m}$ , están constituidos por un lumen central rodeado por un epitelio seminífero especializado, el cual se encuentra formado por dos tipos celulares diferentes: las células de Sertoli y las células espermatogénicas (espermatogonias, espermaticitos y espermátidas). Este epitelio seminífero se encuentra rodeado por una membrana basal y una pared externa formada por fibras de colágeno, fibroblastos asociados y una fina capa de células mioideas peritubulares (PTCs) (Holstein *et al.*, 1996).

Las células espermatogénicas del epitelio seminífero se encuentran en distintas etapas de maduración. Las espermatogonias son células diploides que se encuentran en el compartimento basal. Estas células se dividen por mitosis para formar más espermatogonias y espermaticitos primarios. Los espermaticitos primarios, espermaticitos secundarios, espermátidas y espermatozoos son las células del epitelio que ocupan el compartimento adluminal. Los espermaticitos primarios sufren una primera división meiótica para formar los espermaticitos secundarios, que experimentarán una segunda división meiótica para convertirse en espermátidas haploides. Finalmente estas células haploides se transformarán en espermatozoos durante el proceso conocido como espermiogénesis mediante la eliminación de gran

parte de su citoplasma, el reordenamiento de sus orgánulos y la formación de flagelos (Fig. 1B)

Los espermatozoos recién formados son inmóviles pero gracias a la capacidad contráctil que proporciona las células mioides peritubulares a los túbulos seminíferos, estos espermatozoos avanzan por los conductos rectos unidos al extremo abierto de cada túbulo seminífero hasta llegar a la red testicular. De esta red testicular salen 10 o 20 túbulos cortos conocidos como conductillos eferentes, a través de los cuales abandonan el testículo, alcanzando el epidídimo donde finalmente los espermatozoides terminan su maduración y adquieren su movilidad.

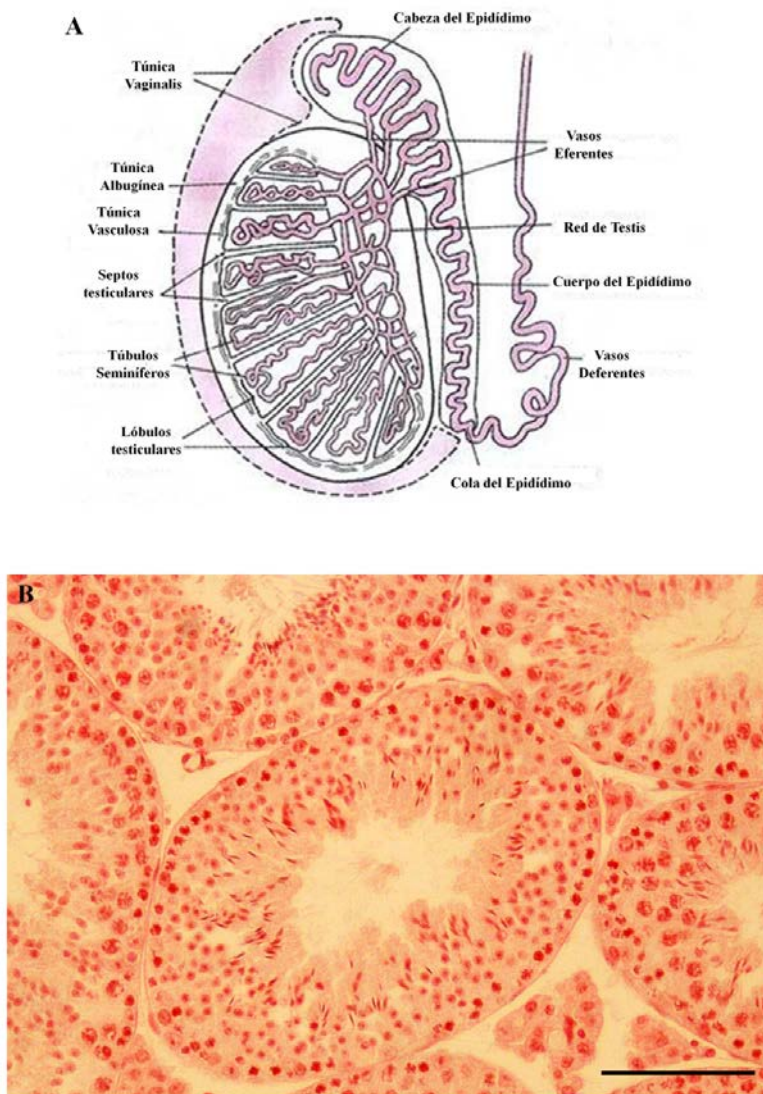


Fig. 1: **Anatomía del testículo.** (A) Representación de una sección longitudinal del testículo con los principales componentes indicados. (B) Sección longitudinal de un túbulos seminífero donde se puede apreciar el epitelio seminífero. Barra de escala 100µm.



### 1.3. Vascularización del Testículo y los TGCTs

De manera general podemos diferenciar la red vascular de cada testículo que se deriva a partir de la arteria testicular que junto al conducto eferente, desciende hacia el escroto. Esta arteria testicular se ramifica antes de perforar la cápsula del testículo para constituir los elementos vasculares intratesticulares.

En un testículo sano, la red vascular se encuentra altamente organizada pudiéndose diferenciar un grupo de capilares con orientación longitudinal que discurren de forma paralela al túbulo seminífero y otro grupo de capilares transversales que se conectan con los longitudinales cada 100-200  $\mu\text{m}$ . Este patrón vascular posee una densidad homogénea y unos ángulos de ramificación característicos (Fig. 2 A, B).

Sin embargo, durante el desarrollo de la mayor parte de neoplasias, como en el caso de los TGCTs la arquitectura de sistema vascular es caótica, presentando una densidad de los vasos mayor y desorganizada con características de propias de un sistema vascular inmaduro (Silván *et al.*, 2010). Los vasos generados en los TGCTs experimentales, son irregulares, a menudo presentan finales ciegos y zonas comprimidas (Silván *et al.*, 2009a y Fig. 2 C y D). Como consecuencia el suministro de riego sanguíneo se ve alterado, zonas del testículo reciben una pobre oxigenación y aparecen zonas de hipoxia.

Se ha observado que los TGCTs son capaces de adaptarse a este ambiente deficitario incrementando la expresión de factores que promueven la vascularización tales como VEGF-A y C, los receptores VEGF 1, 2 y 3 y la molécula PECAM-1 (Silván *et al.*, 2010). Estos factores junto con otros todavía sin describir generarían un microambiente propicio para que tenga lugar una neovascularización a partir de las poblaciones celulares más indiferenciadas que se encuentran presentes en los TGCTs favoreciendo así el desarrollo y la progresión del los tumores (Silván *et al.* , 2009a - 2009b). Hasta el momento los ensayos clínicos con agentes angiogénicos han resultado decepcionantes (Kerbel, 2008) por lo que un mayor conocimiento de los procesos de vascularización asociados a los tumores mejoraría la prognosis de los tumores aumentando la eficacia de las terapias dirigidas para el control de los procesos de angiogénesis.

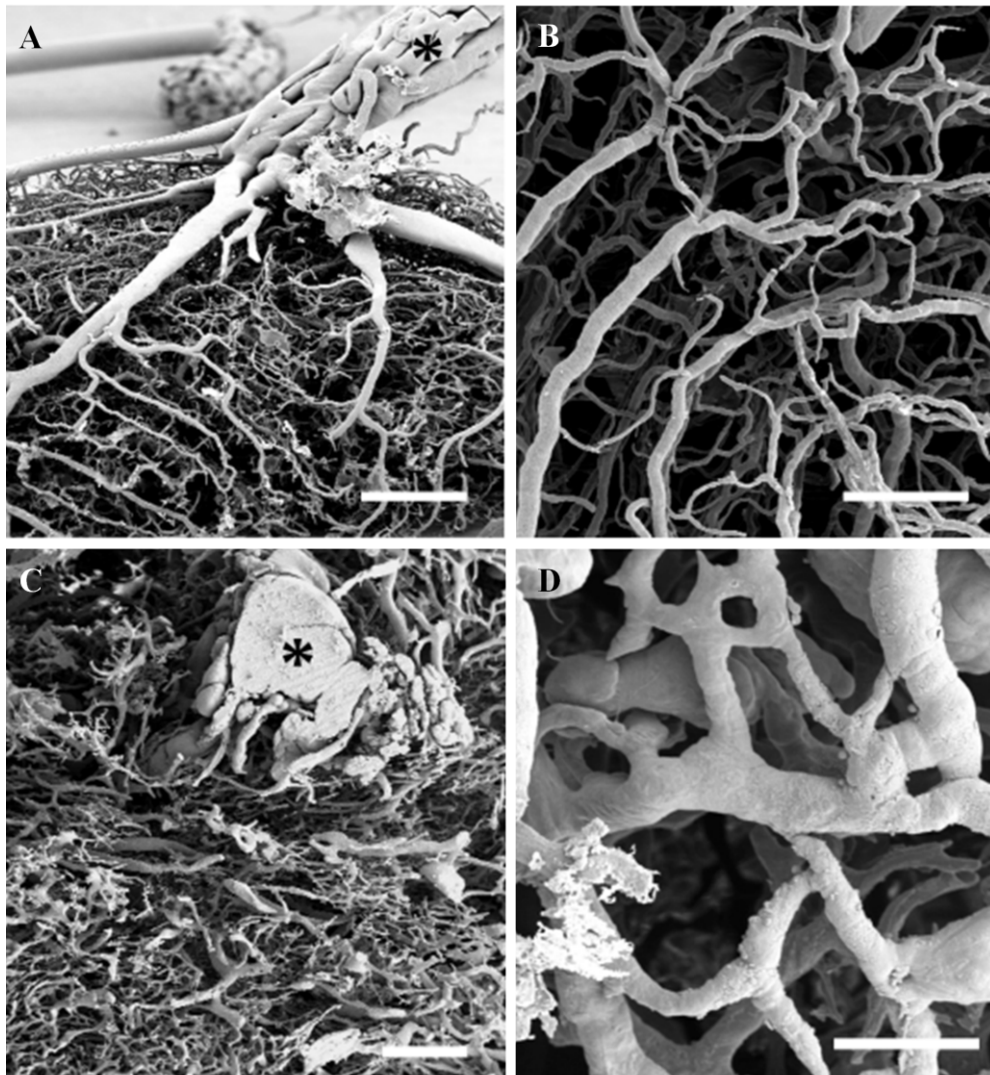


Fig. 2: Imágenes SEM de moldes de corrosión de los sistemas de vascularización en el testículo de ratón y de los tumores TGCTs experimentales. (A) Sistema vascular del testículo de un ratón a través por el cual se produce el suministro sanguíneo del testículo (\*). (B) Imagen ampliada del sistema vascular en el que se puede observar la organización estructurada de los capilares que se distribuyen paralelamente a los túbulos seminíferos. (C) Sistema vascular correspondiente a un TGCT experimental donde la arquitectura se ha perdido completamente. Sin embargo, todavía se puede observar grandes vasos (\*). (D) Imagen ampliada de la morfología de los vasos de un TGCT experimental. Se aprecian los tamaños irregulares de los capilares y varios finales ciegos. Barras de escala 600  $\mu\text{m}$  (A, C); 200  $\mu\text{m}$  (C) y 100  $\mu\text{m}$  (D). (Silván *et al.* 2013)

#### 1.4. El Nicho Celular de las Espermatogonias y su papel en los TGCTs

La perpetuidad de las células madre (SC) es uno de los principales factores para el mantenimiento de la homeostasis tisular en mamíferos y otros vertebrados. Durante el desarrollo embrionario las SC dan lugar a una variedad de tejidos que mantienen un reservorio de células indiferenciadas en constante renovación. La plasticidad en la capacidad de renovación como en la diferenciación llevada a cabo por estas células indiferenciadas será variable en función del tejido en el que se encuentren.

Se diferencian tres tipos de SC: unipotentes, programadas para diferenciarse en tipos celulares órgano-específicos; multipotentes, que se diferencian en las líneas celulares hematopoyéticas y finalmente, las células de la línea germinal (pluripotentes), programadas para diferenciarse hacia líneas celulares distintas en función de las condiciones a las que se encuentren sometidas. Por lo tanto, la plasticidad mencionada anteriormente, así como la diferenciación que llevan a cabo las SC se encuentra regulada por el microambiente que les rodea. Este microambiente es conocido como el nicho celular de las SC, resultado de las diferentes señales tanto de tipo químico como físico procedente de las células que rodea a las SC. La importancia del nicho de las SC radica en que los posibles desajustes que se lleguen a producir en este microambiente juegan un papel fundamental en correcto funcionamiento de las SC, pudiendo causar pérdidas en la homeostasis de los tejidos y diferentes situaciones patológicas que abarcan desde enfermedades de tipo degenerativo hasta el desarrollo del cáncer (Blagoev *et al.*, 2011; Bonafè *et al.*, 2012).

El nicho correspondiente a las células madre de las espermatogonias (SSC) adquiere un interés especial debido a que la espermatogénesis es un proceso indispensable para la perpetuación de las especies y cualquier proceso que altere el microambiente de las SSC puede traer una disminución o pérdida de la fertilidad de los individuos (Oatley & Brinster, 2008). En el contexto de los TGCTs, los cambios asociados al nicho de las SSC jugarían un papel determinante en el desarrollo de aquellos tumores de células germinales derivados de una diferenciación incompleta de las PGCs durante el desarrollo embrionario.

La membrana basal del epitelio seminífero es donde se localiza el nicho de las SSC, los tipos celulares más importantes debido a su proximidad son las células de Sertoli y las PTCs que junto a los componentes del espacio intersticial (células de Leydig,

fibroblastos, capilares sanguíneos y linfáticos) contribuyen al correcto establecimiento del nicho de las SSC que regulará diferentes funciones de las células madre del testículo tales como los procesos de auto-renovación, diferenciación o apoptosis celular (Oatley & Brinster, 2012).

Teniendo en cuenta estas consideraciones que destacan la importancia de un equilibrio en el microambiente testicular para el correcto funcionamiento del mismo, es de gran interés el estudio de la relación entre las alteraciones que se producen en el nicho de las SSC como consecuencia del desarrollo y progresión de los TGCTs (Fig. 3) (Díez-Torre *et al.* 2010; Timmer *et al.*, 1994).

Las células de Sertoli son células cilíndricas que poseen un núcleo oval, claro, localizado en la parte basal con un gran nucléolo central. Entre sus funciones generales más conocidas, destacan la protección y la nutrición que proporcionan a las células espermatogénicas; su capacidad para fagocitar remanentes citoplasmáticos de las espermátides y son parte fundamental en el establecimiento de la barrera hematotesticular. Estas células son las únicas células somáticas que se encuentran en el interior del túbulo seminífero y por tanto, en contacto directo con las células de la línea germinal lo que les confiere un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis del nicho de las SSC. Se han identificado dos factores de crecimiento fundamentales en la auto-renovación de las SSC secretados por las células de Sertoli: el *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) y el *fibroblast growth factor 2* (FGF2).

Cultivos *in vitro* de células SSC suplementados con GDNF muestran una mayor capacidad de restablecer la espermatogénesis tras ser trasplantadas de nuevo al interior del túbulo seminífero (Nagano *et al.*, 2003). Además de GNGF, se ha demostrado también la necesidad de otros factores como FGF 2 y EGF para un mantenimiento de los cultivos de SSC *in vitro* a largo plazo (Lee *et al.*, 2007). Los ratones *knockout* para GNGF poseen unos testículos en los que la mayoría de sus túbulos seminíferos carecen de células germinales, mientras que ratones mutantes que sobreexpresan el gen para GNGF muestran una acumulación de espermatogonias indiferenciadas y una elevada incidencia de tumores de células germinales similares los seminomas encontrados en el hombre (Meng *et al.*, 2000).

Debido a la implicación de las moléculas de adhesión en los procesos asociados al cáncer (Wang *et al.*, 2012), los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios del

patrón de expresión de estas moléculas en diferentes neoplasias (Timmer *et al.*, 1994; Bloch *et al.*, 1997; Taverna & Hynes, 2001; Ji *et al.*, 2012). En el caso de las neoplasias intratubulares derivadas de células germinales se ha observado que las células de Sertoli sobreexpresan las subunidades  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  y  $\beta_1$  de las integrinas. Particularmente se encuentra descrito el importante papel de la integrina  $\beta_1$  en el proceso de migración por parte de las SSC en el epitelio seminífero. Ratones *knockout* para esta integrina presentan una reducción significativa en la capacidad de colonización por parte de las espermatogonias tras ser trasplantadas al interior del túbulo seminífero (Kanatsu-Sinohara *et al.*, 2012)

Las células de Leydig, a pesar de que se localizan en el espacio intersticial, también participan en el mantenimiento de un nicho adecuado para las SSC mediante sus productos de secreción como el *Colony Stimulating Factor-1* (CSF-1). Experimentos para conservar de las características de SSC en cultivo han demostrado que el uso de CSF-1 junto con GDNF y el FGF2 las mejoran significativamente y por lo tanto, el restablecimiento del proceso de espermatogénesis es mayor tras ser trasplantadas las SSC de nuevo al túbulo seminífero (Oatley *et al.*, 2009). Otro factor importante secretado por las células de Leydig es el *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1). Este factor, al igual que los mencionados anteriormente, incrementa el contenido de SSC en el cultivo de espermatogonias (Kubota *et al.*, 2004). Aunque en el testículo, el IGF-1 no es secretado exclusivamente por las células de Leydig, pero sí se ha demostrado por el IGF-1 derivado de estas células media en el mantenimiento de la pluripotencia de las SSC y les confiere el fenotipo característico de las PGCs (Huang *et al.*, 2009).

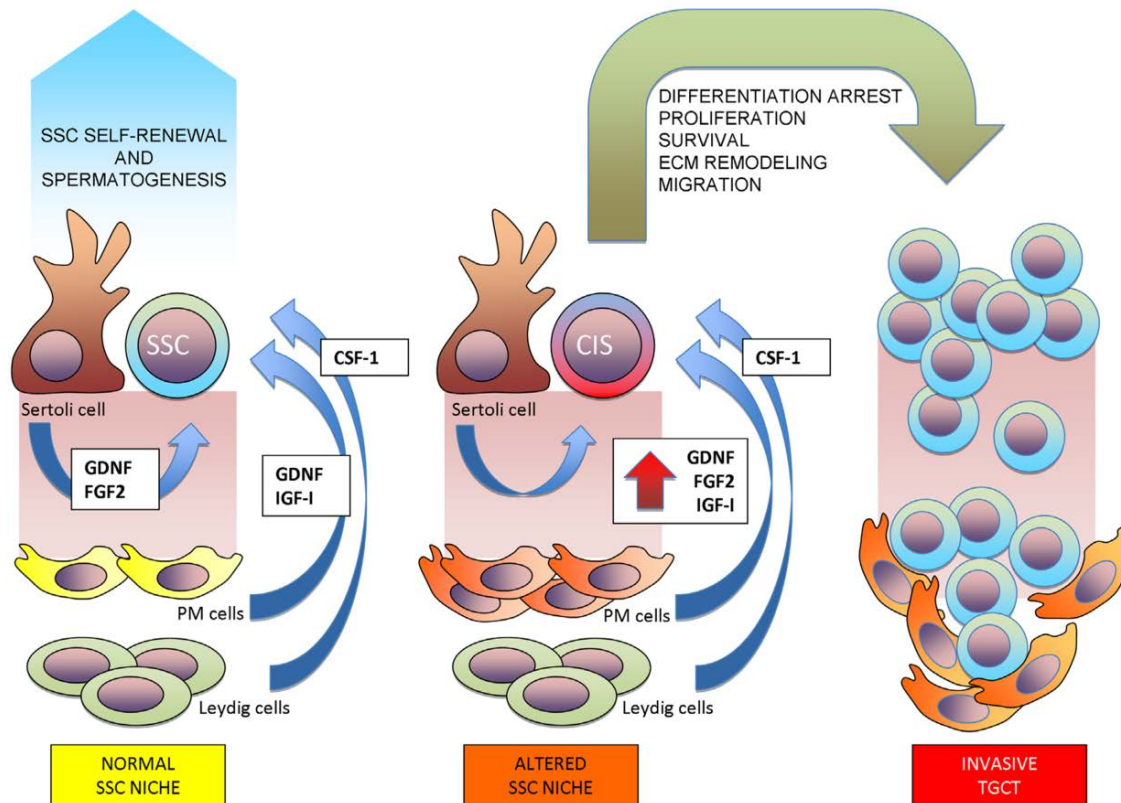


Fig. 3: **El nicho de las células madre espermatoogónicas (SSC) y su posible implicación en las progresión de los tumores derivados de células germinales.** En el microambiente del nicho de las SSC las células de Sertoli se presentan como el principal regulador debido a la secreción de factores como GDNF y FGF2. Las células de Leydig secretan CSF-I y en humanos, se ha descrito la capacidad de secretar por parte de las células mioideas peritubulares (*PM cells*) GDNF e IGF-I. Los factores derivados por la presencia de un *CIS* alterarían el equilibrio del nicho de SSC incrementando la secreción de estos factores que se encuentran relacionados con los procesos de diferenciación, proliferación e invasión de los TGCTs (Silván *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta la importancia en la homeostasis testicular de los diferentes componentes secretados por las células que forman parte del nicho de las SSC, sería interesante ampliar el conocimiento hacia los cambios que se generaría en la secreción de unas células tan importantes en la estructura del testículo como son las PTCs para entender mejor el desarrollo y la progresión de los TGCTs.

### 1.5 Las Células Mioides Peritubulares.

Numerosas son las investigaciones sobre las diferentes implicaciones de las células mioides peritubulares (PTCs) que demuestran que además de ser un importante componente estructural, son también un elemento activo en el mantenimiento de la homeostasis del testículo mediante la secreción de diferentes factores (Ailenberg *et al.*, 1988).

Las PTCs son unas células planas, alargadas y positivas para la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Se encuentran, organizadas alrededor de túbulo seminífero (Fig. 4) y poseen un importante papel en la fertilidad masculina, participan en la regulación paracrina de la gónada, así como en el establecimiento del nicho para las células madre del testículo (SSC) (Albrecht *et al.*, 2006; Mayerhofer *et al.*, 2013; Flenkenthaler *et al.*, 2014).

Los componentes del citoesqueleto de las células mioides peritubulares tales como la miosina, la desmina/vimentina, la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y la gran cantidad de filamentos de actina presentan una distribución específica según la especie que se trate. Por ejemplo, en el testículo de la rata, los filamentos de actina dentro de cada PTC rodean longitudinalmente y circularmente a lo largo del eje del túbulo seminífero, formándose así un enrejado característico. Las alteraciones en esta organización característica de los filamentos de actina en las PTCs han sido observadas en procesos donde la espermatogénesis se ve interrumpida, como es el caso del criptorquidia (Maekawa *et al.*, 1996).

Este tipo celular presenta una serie de características morfológicas y marcadores específicos comunes a los fibroblastos y las células del músculo liso, como por ejemplo CD90, CD34, la cadena pesada de la miosina, desmina, vimentina y actina de músculo liso (Davidoff *et al.*, 1990; Albrecht *et al.*, 2006). Las PTCs poseen cierta capacidad contráctil regulada por la acción la molécula angiotensina y el papel de ciertas moléculas de adhesión como las subunidades de las integrinas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_v$   $\beta_1$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$  y la *intra- celular adhesion molecule* (ICAM-1, (Rossi *et al.*, 2002; Magnanti *et al.*, 2001)). Gracias a esta capacidad contráctil, unos espermatozoides sin capacidad de movimiento son propulsados hacía la *rete testis* donde terminarán su maduración (Romano *et al.*, 2005).

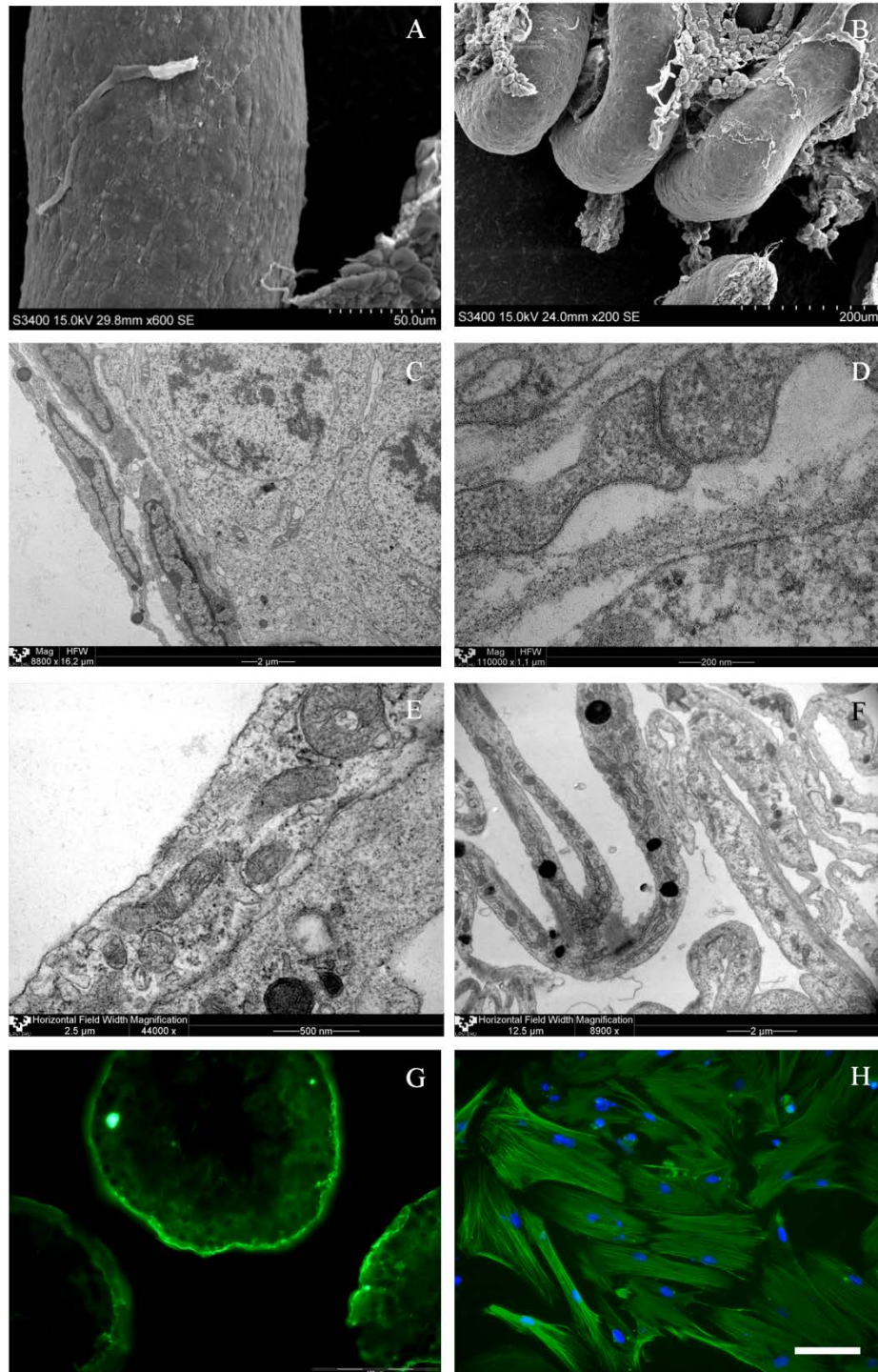


Fig. 4: Células PTCs de los túbulos seminíferos de ratón. (A y B) Imágenes S.E.M. de túbulos seminíferos tapizados por células PTC. (C) Imagen T.E.M. donde se puede apreciar que las PTCs son células alargadas, planas y organizadas en varias capas. (D) Imagen T.E.M. donde se observan las uniones intercelulares mediadas por cadherinas. (E) Pellet de PTCs procesado para T.E.M. donde aparecen cavéolas a lo largo de la membrana plasmática (F) Imagen T.E.M. de un pellet de PTCs que muestra un prominente citoesqueleto microfilamentoso y cuerpos densos para el anclaje de los microfilamentos. (G) Inmunofluorescencia de  $\alpha$ -SMA sobre un corte histológico al criostato de túbulos seminíferos. (H) Inmunofluorescencia de  $\alpha$ -SMA de un cultivo primario de PTCs



En cuanto a la expresión de receptores de andrógenos es una característica común de las células de Sertoli, las células de Leydig, espermátidas y PTCs (Anthony *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 2002), demostrándose que la señal androgénica procedente de las células de Leydig se encuentra involucrada en el correcto funcionamiento de las células de Sertoli y la capacidad contráctil de las PTCs (Zhan *et al.*, 2006). En esta interacción andrógeno dependiente entre las PTCs y las células de Sertoli, se ha sugerido a la molécula PModS, secretada por las células mioides peritubulares, como moduladora de la secreción por parte de las células de Sertoli de moléculas tan importantes como la transferrina, inhibina y proteínas andrógenas de unión (Verhoeven *et al.*, 2000). Aunque también existen otros factores derivados de las PTCs, como por ejemplo IGF-I, bFGF y diversas citoquinas que comparten la mayoría de esos efectos que ejerce PModS sobre las células de Sertoli, por lo que podría atribuir a estas moléculas también esta función reguladora (Verhoeven *et al.*, 2000). Estas alteraciones en los niveles de transferrina e inhibina hace interesante el estudio de la implicación en la modulación de su secreción por parte de las células PTC ya que estas moléculas han sido relacionadas con el aumento en la invasión y mala prognosis en diferentes tipos de tumores (Mylonas *et al.*, 2005; Blathan *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Habashy *et al.*, 2010).

La participación de las PTCs en los procesos de regulación de la espermatogénesis y el desarrollo testicular mediante la secreción de factores tales como Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) (El Ramy *et al.*, 2005), TGF- $\beta$  (Konrad *et al.*, 2000a) o varios componentes de la matriz extracelular (Ailenberg *et al.*, 1988) ha sido demostrada en modelos murinos (Mackay & Smith, 2007). Hay que destacar que la secreción de la membrana basal que separa el epitelio seminífero del mesénquima es una de las principales funciones de las PTCs junto con las células de Sertoli.

Esta membrana basal en cuya formación participan las PTCs posee una función estructural crucial para la propia constitución del túbulo seminífero durante el desarrollo testicular (Konrad *et al.*, 2000b; Weber *et al.*, 2002). Además durante el proceso de invasión del mesénquima por parte del carcinoma, la membrana basal ejerce una función de barrera física que contiene a las células del tumor. Por tanto, los cambios que se produzcan en la actividad secretora de las PTCs en un microambiente tumoral podrían suponer una pérdida de la homeostasis en la membrana basal que contribuiría a la progresión de los TGCTs hacia el exterior del túbulo seminífero; tal y como se ha observado en otro tipo de neoplasias (Timmer *et al.*, 1994; Gaggioli *et al.*, 2007).

Durante los procesos de invasión se han estudiado moléculas como por ejemplo el PDGF, un factor que se encuentra presente en testículos sanos pero aparece sobreexpresado en algún otro tipo de tumores (Wang *et al.*, 2010). En el testículo de rata se ha observado que este factor estimula el aumento en el tamaño, proliferación y secreción de la matriz extracelular en las PTCs (Gnessi *et al.*, 1993; Chiarenza *et al.*, 2000), produciendo un aumento en el grosor de la pared del túbulo testicular. Además, también se ha observado que tratamientos con PDGF regulan la expresión de  $\alpha$ -SMA y aumentan la sensibilidad de las células mioideas peritubulares a la endotelina, lo cual podría estar relacionado con una mayor capacidad contráctil de estas células (Romano *et al.*, 2006).

A parte de PDGF, otras moléculas como la Interleucina-1 $\alpha$  también se encuentra involucrada en el desarrollo testicular como un factor paracrino. Esta interleucina es la primera que se expresa en el testículo de las ratas a los 20 días del nacimiento, principalmente por parte de las células de Sertoli, y posee un efecto mitogénico tanto en las PTCs como en las células germinales (Svechnikov *et al.*, 2004).

Otros estudios *in vitro* ya realizados con PTCs humanas han corroborado que la capacidad secretora de estas células posee una importante implicación en la regulación de la función testicular (Albrecht *et al.*, 2006). Entre los productos de secreción de las PTCs, se han identificado además de las proteínas estructurales como el colágeno I, IV, XVIII, fibronectina, laminina y SPARC, que componen la matriz extracelular mencionada anteriormente, el factor de crecimiento neural (NGF), la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y varias interleucinas inflamatorias, entre las que se encuentra la IL-6 (Schell *et al.*, 2008).

Al tener en cuenta todas estas observaciones sobre la capacidad de secreción de las PTCs y su importancia en la homeóstasis testicular, junto con la proximidad de las células mioideas peritubulares del testículo al CIS, estas células se convierten en más que meros elementos estructurales del túbulo seminífero, ya que las posibles alteraciones en el microambiente testicular que se producirían por los factores derivados de las células tumorales, podrían generar cambios en el fenotipo y esta capacidad secretora de las PTCs contribuyendo así al crecimiento, invasión y metástasis de los tumores derivados de las células germinales como parte activa importante del estroma reactivo asociado al tumor (Fig. 5) (Diez-Torre *et al.* 2011).

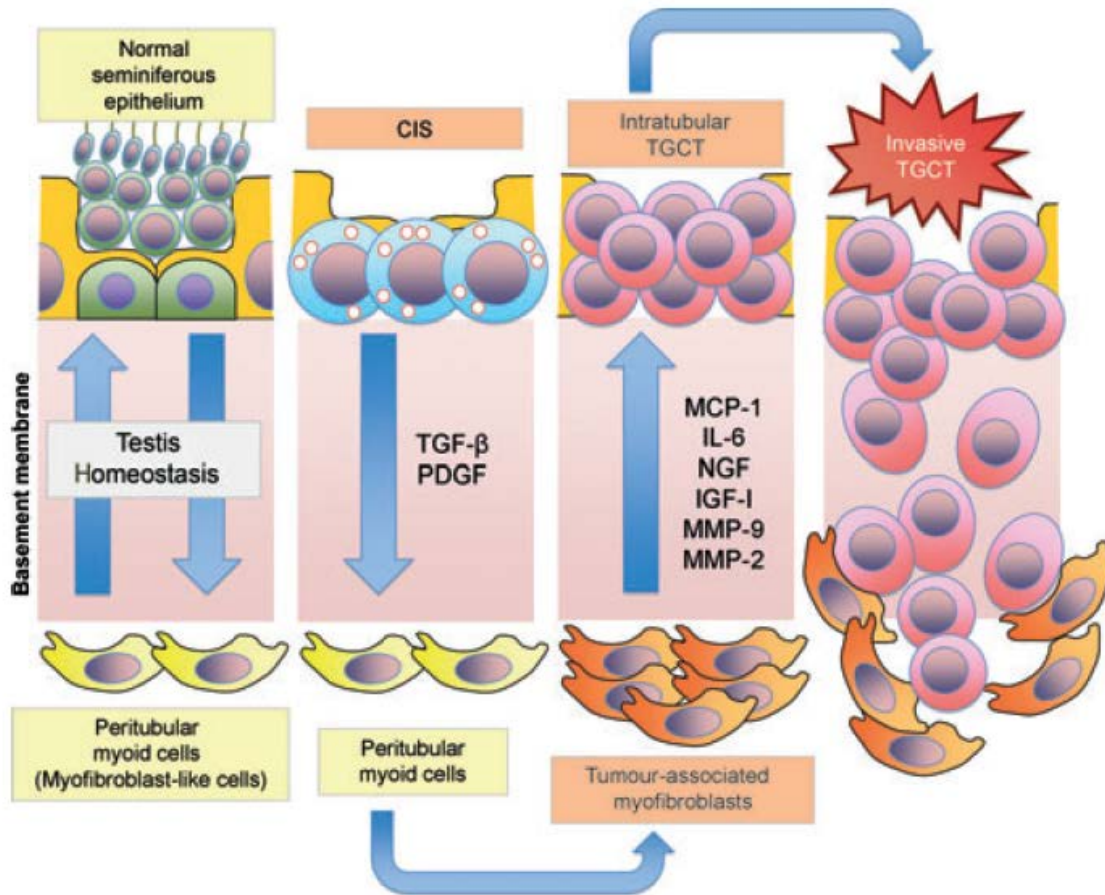


Fig. 5: Posible papel de las células mioides peritubulares en el proceso de invasión de los tumores derivados de células germinales: la interacción entre el epitelio seminífero y el estroma mantiene la homeostasis testicular durante el correcto funcionamiento del testículo. Cuando el CIS aparece, se desequilibra el funcionamiento normal del testículo y las nuevas células neoplásicas intratubulares secretan diversos factores de crecimiento tales como TGF- $\beta$  y el PDGF, los cuales serían capaces de reclutar y diferenciar las células del estroma, incluyendo células mioides peritubulares, en células tipo miofibroblastos. Por consiguiente estas células del estroma tumoral secretaría una serie de factores que favorecerían en crecimiento, desarrollo e invasión de los TGCTs (Díez-Torre et al. 2011).

### **1.6. Las Metaloproteasas de Matriz Extracelular (MMPs) y sus Inhibidores Tisulares (TIMPs).**

La matriz extracelular (ECM) es una compleja red de macromoléculas extracelulares entre las que se encuentran el colágeno, la fibronectina, laminina y otras muchas glicoproteínas. La interacción de estas moléculas con las células que la rodean juega un papel fundamental en el normal funcionamiento y en el mantenimiento de los tejidos.

Aunque durante los procesos de invasión tumoral, la matriz celular actúa en primera instancia como barrera que limita, en cierto modo, el crecimiento del tumor y su capacidad de invadir el estroma y los sistemas vasculares o linfáticos, los componentes de la matriz que se encuentran en estado latente, también pueden convertirse en factores de crecimiento y movilidad en los procesos de invasión tras su activación por la acción de distintas proteasas. La degradación de los componentes de la matriz extracelular, libera y activa una serie de factores de crecimiento, movilidad y supervivencia que terminan actuando como señales pro-invasivas (Yurchenko & Schitny, 1990; Barsky *et al.*, 1983).

La familia de las metaloproteasas de matriz (MMPs) es un grupo de proteasas de especial importancia ya que su actividad conjunta es capaz de degradar prácticamente la totalidad de los componentes de ECM. Esta capacidad apunta a un papel esencial de las MMPs en los procesos fisiológicos que requieren una remodelación radical en la matriz, tales como el desarrollo embrionario, el ciclo endometrial, la reparación de tejidos o la angiogénesis. En los procesos de invasión tumoral, la remodelación de la matriz también es llevada a cabo, por lo que las posibles alteraciones en la actividad de las MMPs serán objeto de estudio en la interacción del tumor con el estroma testicular.

La actividad de las MMPs puede ser regulada a través de los inhibidores de proteasas en general, y de manera más específica, mediante los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). Se ha descrito que los TIMPs inhiben de las MMPs de manera reversible mediante una unión estequiométrica al dominio catalítico de las enzimas a modo de sustrato. Esta actividad inhibidora de los TIMPs junto con estudios que relacionan su sobreexpresión con una reducción de las metástasis experimentales (DeClerck & Imren, 1994) o los bajos niveles de TIMPs con un aumento de la tumorigénesis (Khokha *et al.*, 1989) apoyarían la idea el que el balance entre TIMPs y MMPs en el microambiente tumoral debe ser tenido en cuenta para determinar el

potencial proteolítico de los tumores. Sin embargo, los TIMPs poseen un papel más complejo que una simple inhibición de las MMPs. De hecho, los TIMPs desarrollan una serie de funciones paralelas a tener en cuenta en el microambiente tumoral ya que pueden ser tanto represoras de la progresión tumoral, como es el caso de la inhibición de la angiogénesis por parte de la TIMP-2 (Seo *et al.*, 2003) y TIMP-3 (Qi *et al.*, 2003), como promotoras del crecimiento celular durante el desarrollo del tumor (Hoashi *et al.*, 2003).

Al margen de la degradación de los componentes de la matriz extracelular para facilitar el avance de las células endoteliales, las MMPs ejercen otros papeles importantes como es el caso de su participación ejerciendo un rol de moléculas proangiogénicas o antiangiogénicas en situaciones patológicas (artritis reumatoide, soriasis, cáncer...) y en situaciones no patológicas (desarrollo del embrión, reparación de heridas...) durante el proceso de formación de nuevos vasos a partir de otros preexistentes (angiogénesis). Un ejemplo de esta participación por parte de las MMPs es la proteólisis del colágeno tipo IV que como consecuencia deja al descubierto un sitio de unión a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , la cual participa en la inducción de la angiogénesis (Nisato *et al.* 2005). Otras MMPs en cambio, participan en la aparición de factores antiangiogénicos, como por ejemplo las MMP-2,-7,-9 y -12, que intervienen en la formación de la molécula angiostatina, un potente inhibidor de la angiogénesis que surge como producto de la degradación que llevan a cabo del plasminógeno (O'Reilly *et al.*, 1999).

Estructuralmente las metaloproteasas de matriz (MMPs) son un grupo de endopeptidasas  $Zn^{2+}$  - y  $Ca^{2+}$  - dependientes que comparten un mismo patrón de varios dominios (Fig. 2). Un péptido señal N-terminal dirige la secreción de los proenzimas que contienen un propéptido de secuencia altamente conservada [PRCG(V/N)PD] en el que la cisteína está unida covalentemente con el ion  $Zn^{2+}$  del dominio catalítico y que mantiene la pro-MMP en estado latente. Los dos módulos de este centro catalítico se encuentran separados por el centro activo en el cual se localizan los tres residuos de histidina responsables de la unión del  $Zn^{2+}$  esencial para la actividad proteolítica de las MMPs, este centro activo de las MMPs se encuentra conservado en todas ellas. Además del zinc catalítico mencionado anteriormente, también forman parte de la estructura general de estas proteínas otro ion zinc y un ion de calcio.

Otro componente estructural presente en la mayoría de las MMPs, a excepción de las matrilisinas y la MMP-23, es un dominio C-terminal (dominio hemopexina) unido al dominio catalítico por una región rica en prolinas que interviene en la unión al sustrato y en la interacción con los inhibidores de metaloproteasas de tejido (TIMPs)

En la figura 6 se puede observar como las MMPs, a partir de su estructura básica, pueden dividirse en distintos subgrupos basándose en distintas peculiaridades y en su sustrato específico.

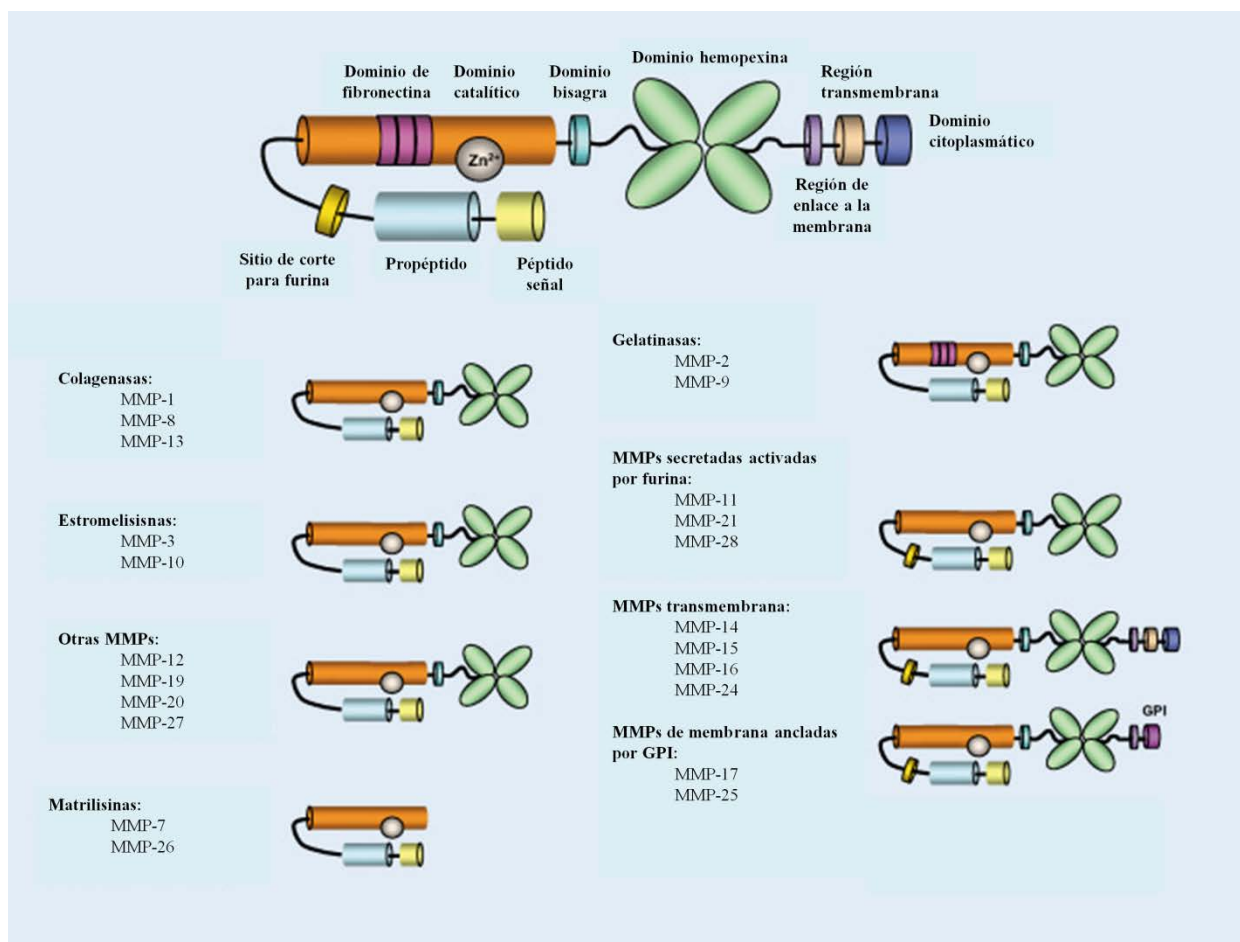


Fig.6: Clasificación de las MMPs según su estructura. Modelo propuesto por Folgueras *et al.*, 2004

A pesar del potencial del estudio de las MMPs para el tratamiento de otro tipo de tumores (Nuti *et al.* 2007; Gialeli *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2011), el papel de estas proteasas en la progresión del TGCT no se encuentra descrito todavía de manera precisa. En los estadios iniciales del desarrollo del TGCT, la membrana basal del túbulo seminífero constituye, tal y como se ha comentado con anterioridad, una barrera física que previene la invasión de la mesénquima por parte de las células del carcinoma. Por lo

tanto, el estudio de los cambios en la actividad secretora de las MMPs en el testículo y más concretamente por parte de las PTCs, resulta interesante para poder evaluar la implicación de estas células en el mantenimiento de la integridad de la membrana basal durante las primeras fases de invasión por parte de TGCT desde el interior del túbulo hacia el exterior.

La MMPs objeto de un estudio preliminar fueron las colagenasas **MMP-1** que actúa principalmente sobre el colágeno tipo III, la **MMP-8** que actúa sobre el colágeno tipo I y la **MMP-13**, que degrada la gelatina de forma más efectiva que las otras dos colagenasas mencionadas anteriormente (Sato *et al.*, 1994). Además de poseer una mayor actividad sobre el colágeno tipo II. Las MMPs estromelisin **MMP-3** y la **MMP 11** que se encuentran relacionadas en cuanto a su estructura y sustrato. La MMP-3 es expresada por queratocitos y fibroblastos tanto *in vivo* como *in vitro* y ejerce un papel durante el desarrollo de las glándulas mamarias así como durante la remodelación de la matriz extracelular en el período de lactancia (Thomasset *et al.*, 1998). La MMP-11 se encuentra expresada en tumores invasivos, como es el caso de los tumores de mama. Esta MMP es secretada por los fibroblastos adyacentes en los carcinomas de células basales, escamosas y dermatofibromas (Thewes *et al.*, 1999) así como por algunas células tumorales que han sufrido en cierto grado los procesos de transición epitelio-mesénquima (Ahmad *et al.*, 1998). En cuanto a la expresión de la **MMP-12**, ésta es producida de manera constitutiva por parte de macrófagos y alguna otra célula que se encuentra asociada a la placenta. También aparece en células tumorales de carcinoma cutáneo de células escamosas y macrófagos de áreas donde la membrana basal se encuentra alterada (Vos *et al.*, 2003). Las matrilisina **MMP-7** es expresada de forma constitutiva por distintos tipos de células epiteliales y en situaciones patológicas. Esta MMP parece que juega un papel importante en tumores intestinales del tipo colorrectal (Mimori *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 1999). En cuanto a las MMPs de membrana, se eligió la MT1-MMP (**MMP-14**), cuya expresión por parte de las células del estroma es inducida por las células del tumor para la degradación de varios componentes de la ECM (Koyama, 2004).

Especial atención merecieron la gelatinasa-A (**MMP-2**) y la gelatinasa-B (**MMP-9**), dos metaloproteasas con un dominio catalítico de tres repeticiones en tándem de una secuencia de 58 aminoácidos similares a módulos de fibronectina tipo II.

La capacidad que poseen estas gelatinasas de degradar el colágeno tipo IV, principal componente de la matriz extracelular y la membrana basal, hace pensar que estas metaloproteasas juegan un papel fundamental respecto a otras MMPs. Los patrones de expresión de MMP-2 y MMP-9 han sido estudiados en numerosos ensayos clínicos y experimentales (Roomi *et al.*, 2009), donde diferentes tipos de tumores muestran niveles de expresión de MMP-2 y MMP-9 distintos. Por ejemplo, en cáncer de ovario la expresión de MMP-9 es elevada respecto a cáncer de mama o vejiga (Schmaltfeldt *et al.*, 2001). Otros ejemplos como son el cáncer de colon, páncreas, próstata o melanoma, muestran un incremento significativo en la expresión de MMP-2 (Bérubé *et al.* 2005). En general, se ha descrito que la activación de la MMP-2 durante el desarrollo del tumor suele ir asociada a la malignización del mismo y a un mal pronóstico (Zhang *et al.*, 2006). Además, estudios con ratones deficientes para MMP-2 y MMP-9 han demostrado una disminución en los procesos de angiogénesis, progresión y metástasis de los tumores inducidos de forma experimental (Itoh *et al.*, 1998; Nabeshima *et al.*, 2002). Mientras que de una manera más concreta con técnicas de hibridación *in situ*, la expresión tanto de la MMP-2 como de la MMP-9 ha sido localizada en los fibroblastos asociados al estroma reactivo del frente de invasión tumoral (Polette *et al.*, 1993). Este hecho induce a pensar que la expresión diferencial de estas dos MMPs es producto de las interacciones que se producen en la zona “epitelio-estroma” (Singer *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta estos estudios sobre la expresión de MMPs vinculada a los procesos tumorales, se ha tratado de estudiar su expresión y secreción por parte de las PTCs, prestando especial atención a las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 en el microambiente tumoral de los TGCTs, sabiendo que en un testículo sano, las PTCs expresan la MMP-2 de manera constitutiva, mientras que los niveles de expresión de la MMP-9 son por lo general, muy bajos.

### **1.7. La citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$**

Las citoquinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular que actúan mediando interacciones celulares complejas. Fundamentalmente son producidas por los linfocitos, macrófagos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales, adipocitos, células del tejido muscular (miocitos) y del tejido conjuntivo. Las funciones de las



citoquinas son muy variadas, destacando su participación en la diferenciación, maduración y comunicación entre las células del sistema inmunitario.

Entre las diferentes citoquinas liberadas durante procesos inflamatorios asociados diferentes patologías como por ejemplo los procesos asociados al cáncer, se encuentra el Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , abreviatura del inglés *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ). A pesar de que la capacidad del TNF- $\alpha$  producido por el sistema inmune para causar necrosis tumoral fue descubierta hace ya más de 40 años, los mecanismos moleculares que median en la transducción de la señal generada por esta molécula siguen siendo objeto de numerosos estudios (Wajant *et al.*, 2003).

El TNF- $\alpha$ , estructuralmente se puede encontrar de dos formas diferentes: integrado en la membrana celular formando un homotrímero estable (memTNF- $\alpha$ ) y en forma soluble (sTNF- $\alpha$ ). El sTNF- $\alpha$  es una proteína trimérica de 51 kDa producida por la acción proteolítica de la enzima TACE (enzima convertidora de TNF- $\alpha$ ) sobre a memTNF- $\alpha$ . Este trímero soluble tiende a disociarse en protómeros de 17 kDa por lo que la bioactividad del sTNF- $\alpha$  desciende, encontrándose a concentraciones del rango nanomolar (Fig. 7A). Tanto la forma transmembrana como la forma soluble del TNF- $\alpha$  llevan a cabo sus funciones biológicas gracias a la interacción de esta molécula con los dos receptores de membrana, TNF-R1 y TNF-R2. Cada receptor posee dominios extracelulares con cuatro repeticiones en tándem ricas en cisteína a través de los cuales interacciona con el TNF- $\alpha$ . El TNF-R1 se encuentra expresado de manera constitutiva en la mayoría de los tejidos y parece ser que el principal mediador en la señalización del TNF- $\alpha$  y las vías que se activan a partir de este receptor están mejor descritas que las del TNF-R2, cuya activación completa sólo se realiza a través del memTNF- $\alpha$  (Fig. 7B). La expresión del TNF-R2 se encuentra altamente regulada. Aparece principalmente en las células asociadas al sistema inmune y juega un papel más específico que el TNF-R1 en las reacciones que se producen en el sistema linfático (Grell *et al.*, 1995).

En general, una de las de las características funcionales más destacables de la molécula TNF-  $\alpha$  es que presenta una dualidad ya que interviene en procesos de regeneración y destrucción de tejidos (Yamada *et al.*, 1997; Probert *et al.*, 1995). Y la forma en la que participe en cada caso depende del contexto celular en el que se encuentre teniendo en

cuenta parámetros como la composición de receptores o el tiempo de exposición del TNF-  $\alpha$  (Wajant *et al.*, 2003).

Un ejemplo de la dualidad de la molécula en un microambiente tumoral es la elevada citotoxicidad que ejerce sobre células tumorales ampliamente demostrada en experimentos *in vitro* así como la capacidad que posee el TNF- $\alpha$  de contrarrestar los efectos de la molécula TGF- $\beta$  en la transición epitelio-mesénquima (EMT) que sufren los fibroblastos asociados al tumor (CAFs) y la secreción de MMP-9 durante el desarrollo del tumor (Stuelten *et al.*, 2005).

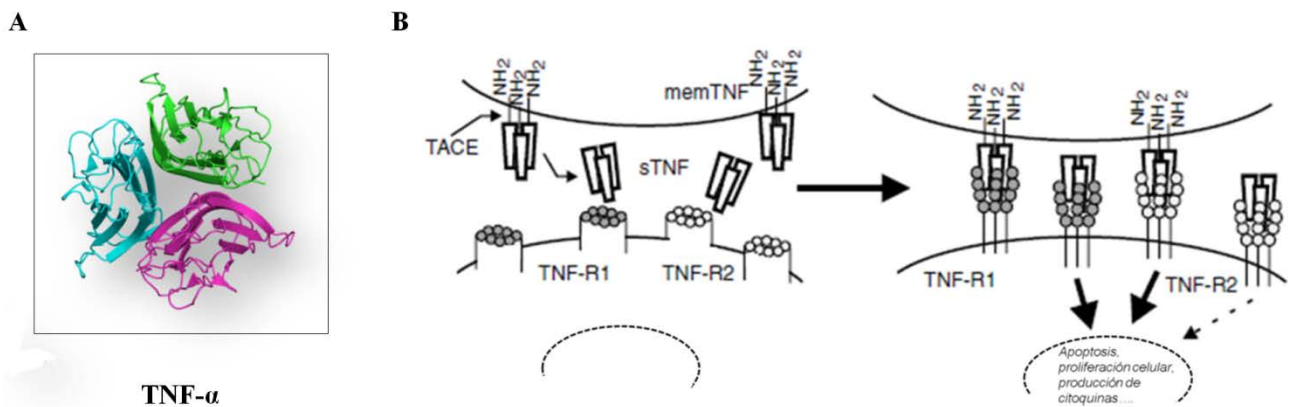


Fig.6: **La molécula Tumor Necrosis Factor –  $\alpha$** : (A) Estructura cristalina de la molécula homotrímica TNF- $\alpha$ . Cada monómero se encuentra plegado formando una estructura de *jelly roll* de bandas  $\beta$  antiparalelas. Las zonas de unión con los receptores son los canales presentes entre monómeros (Reed *et al.*, 1997). Fuente: *Protein Data Bank* (<http://www.ebi.ac.uk/research>). (B) Biología del memTNF- $\alpha$  y sTNF- $\alpha$ . El memTNF- $\alpha$  es precursor de s TNF- $\alpha$  y ambos se unen a dos miembros de la superfamilia de receptores, TNF-R1 y TNF-R2. Mientras que el TNF- $\alpha$  es capaz de activar los dos receptores, s TNF- $\alpha$  estimula principalmente al TNF-R1.

Debido a la importancia adquirida por el del TNF- $\alpha$  por sus implicaciones en la respuesta inmune de diferentes patologías, el aumento que ejerce en la capacidad de migración celular (Ponte *et al.*, 2007) y el efecto descrito sobre los procesos de regulación de la actividad secretora de las PTCs y las consecuencias asociados en la espermatogénesis masculina (Shell *et al.*, 2008), suscitaron nuestro interés en el estudio del posible papel de esta citoquina en un microambiente tumoral asociado al TGCT.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS:

El presente trabajo de Tesis Doctoral tuvo los siguientes objetivos:

1.- Establecer un modelo válido de co-cultivo celular para el estudio *in vitro* de la interacción que se produce entre las células mioides peritubulares del testículo de ratón (PTCs) y los tumores derivados de células germinales (TGCTs) en sus estadios iniciales.

2.- Estudiar la respuesta de las PTCs durante las primeras fases de invasión del tumor testicular, analizando la variación de la capacidad de migración de estas células. Así como a la expresión y secreción de factores proinvasivos, prestando especial atención a las metaloproteasas de la matriz (MMPs).

3.- Analizar las posibles implicaciones del efecto del factor de necrosis tumoral *alpha* (TNF- $\alpha$ ) en la respuesta de las PTCs durante el desarrollo de los TGCTs.

4.- Realizar una aproximación *in vivo* para una descripción de los cambios en el estroma testicular y más concretamente en las posibles alteraciones de las PTCs que conforman la pared del túbulo seminífero mediante la técnica de trasplante de células madre al interior del túbulo seminífero de ratón.

## **MATERIALES y MÉTODOS**

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

##### **3.1.1. RATONES SWISS-WEBSTER**

Una gran mayoría de los ratones comercializados en todo el mundo para ser usados en investigación pertenecen a grupos de animales no consanguíneos, exocriados o exogámicos. Su gran popularidad se debe especialmente a que son mucho más baratos que las líneas consanguíneas, son muy buenos reproductores y mansos para el manejo de laboratorio, pero es importante destacar que se trata de animales no definidos genéticamente.

Entre los ratones no consanguíneos más populares podemos citar los Swiss-Webster, CD-1, ICR, y CF-1, todos de uso general. Los ratones llamados Swiss o Swiss-Webster derivan todos de un grupo de 9 ratones llevados desde Suiza hacia Estados Unidos por Clara Lynch en 1926. Allí fueron criados en el *Rockefeller Institute*, Nueva York, desde donde fueron distribuidos a distintos institutos, siempre como ratones exocriados. En la década de 1930, Leslie Webster los pasó a manos de vendedores comerciales, de allí el origen del nombre Swiss- Webster (Benavides & Guénet; 2003).

Es importante tener en cuenta que también existen muchas líneas consanguíneas que han sido desarrolladas a partir Swiss, como SJL/J, SWR, HSFS, ICR/Ha y NIH/Ola, entre otras.

En nuestro caso empleamos ratones Swiss-Webster (Fig.7) a partir de las 8 semanas de edad, que fueron estabulados en jaulas con acceso libre a agua y comida y ciclos lumínicos de 12 horas.

##### **3.1.2. RATONES DE LA RAZA 129 P2**

Los ratones de la raza 129 se caracterizan por presentar un alto índice de teratomas testiculares espontáneos, aunque esta incidencia es muy variable dependiendo de la cepa de la que se trate. Debido al gran número de líneas de células madre generadas a partir de esta raza, es también muy empleada en la producción de animales transgénicos y mutantes. Sin embargo, dentro de esta raza existen grandes variaciones genéticas (Simpson et al., 1997) que recientemente han sido clasificadas en tres grupos:

- P: son los animales provenientes de las cepas originarias.
- T: se caracterizan por portar la mutación “ter” que les confiere un alto índice de tumores testiculares.
- S: portan la mutación Steel.

En nuestro caso empleamos animales de la subcepa 129Ola/Hsd (P2) desarrollada por Dunn en 1928 (Fig.7) y adquiridos directamente a los Laboratorios Harlan® (U.K.). La edad de los roedores utilizados fue a partir de las 6 semanas de edad y las condiciones de cría fueron con acceso libre a agua y comida y ciclos lumínicos de 12 horas en jaulas con un número máximo de 5 individuos.

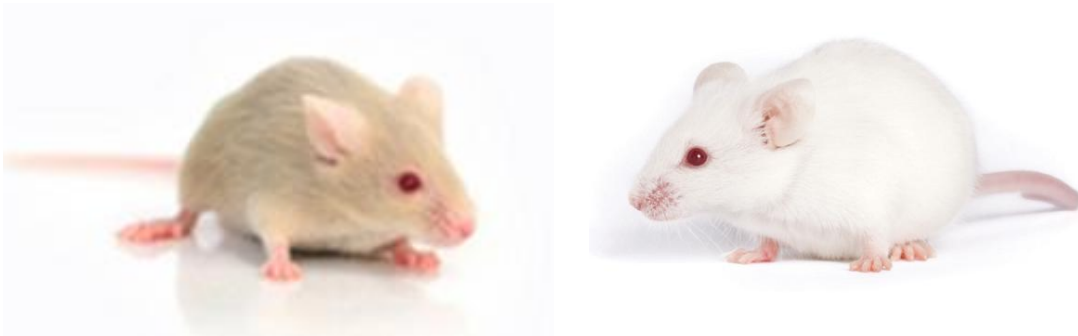


Fig. 7: Ejemplares de los ratones utilizados en la experimentación. Ratón de la subcepa 129Ola/Hsd (P2) (Izquierda) y ratón Swiss (Derecha) procedentes de los Laboratorios Harlan® (U.K.) y del Servicio General de Animalario (Bizkaia), respectivamente.

### 3.2. CULTIVOS CELULARES

#### 3.2.1. SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS EN LOS CULTIVOS

<b>Solución PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) usada en nuestro laboratorio:</b>
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O
1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Nota: En el cultivo de las células mioides peritubulares de testículo (PTC) la solución de PBS se suplementa con un 1% de Penicilina-Estreptomicina (50µg/ml) (Sigma®, P-0781).

<b>Medio de cultivo DMEM completo:</b>
DMEM suplementado con:
10% Suero Bovino fetal (SBF) (Biochrom, S-0115)
1 % L-Glutamina (Sigma <sup>®</sup> , G-6392)
1 % Penicilina-Estreptomicina (50µg/mL) (Sigma <sup>®</sup> , P-0781)

<b>Medio de cultivo MSC para células madre embrionarias:</b>
DMEM suplementado con:
10% Suero Bovino fetal (SBF) (Biochrom, S-0115)
1 % L-Glutamina (Sigma <sup>®</sup> , G-6392)
1 % Penicilina-Estreptomicina (50µg/mL) (Sigma <sup>®</sup> , P-0781)
1% Aminoácidos no esenciales (Sigma <sup>®</sup> , M-7145)
30mg/l Piruvato sódico (Sigma <sup>®</sup> , P-4562)
5mg/l Nucleósidos (Sotck 100X)
7µl/l 2-β-Mercaptoetanol (Sigma <sup>®</sup> , M-7154)
1 µl/ml Factor Inhibidor de Leucemia (ESG1107 <sup>®</sup> , Meck Millipore)
Nota: En el cultivo de las células transfectadas AB1 <sup>tomato</sup> generadas por nosotros se sustituyó el antibiótico Penicilina-Estreptomicina por Gentamicina (G418 Sulfate, Gibco <sup>®</sup> ) a una concentración de 0,3 mg/ml.

### 3.2.2. LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS

#### 3.2.2.1. Línea de Células Madre Embrionarias AB1:

Se trata de una línea de células madre embrionarias establecida a partir de embriones de ratón de la raza 129Sv (McMahon & Bradley, 1990) mediante el método descrito por Evans y Kaufman (Evans & Kaufman, 1981). Fueron cedidas a nuestro laboratorio por el Doctor Allan Bradley, del Baylor College of Medicine, Houston, Texas (USA).



### **3.2.2.2. Líneas de Células de Carcinoma Embrionario F9 y P19**

La línea F9 se clonó a partir de la línea carcinoma embrionario OTT6050 (Berstine et al., 1973). Este tumor se obtuvo implantando un embrión de 6 días de desarrollo en el testículo de un ratón de la cepa 129Sv (Stevens, 1968). Esta línea celular, caracterizada por su incapacidad de diferenciación espontánea, ha sido empleada extensamente en experimentos de análisis de la diferenciación. La obtuvimos de la *European Collection of Animal Cell Cultures* (ECACC, n° 85060401).

La línea celular multipotente P19 se obtuvo de un teratocarcinoma producido tras el trasplante de un embrión de 7 días en el testículo de un ratón de la cepa C3H/He (McBurney & Rogers, 1982). Fue cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Michael McBurney, del Departamento de Medicina de la Universidad de Ottawa, Ontario (Canadá).

### **3.2.2.3. Línea Celular de Fibroblastos STO**

Los fibroblastos STO se establecieron por Alan Bernstein en el Ontario Cancer Institute, Toronto (Canadá) a partir de una línea continua de fibroblastos embrionarios de ratón de la cepa SIM (Sandos Inbred Mice). Es utilizada habitualmente para la formación de “*feeder layers*” para cultivos de células madre embrionarias y del carcinoma embrionario ya que produce óptimas cantidades de LIF.

## **3.2.3. PROTOCOLO GENERAL DE CULTIVO CELULAR**

La manipulación de todos los cultivos celulares la realizamos en condiciones de esterilidad en el interior de campanas de flujo laminar horizontal (ICN Gelaire, modelo HF60). Las células se mantuvieron en cultivo en incubadores con atmósfera normal (21% O<sub>2</sub>) a humedad saturada y 5% de CO<sub>2</sub> (Heraeus, modelo BB6220).

El **cultivo** de las células en monocapa se realiza sobre frascos de plástico de 25cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, 83.3910 y 83.3911) que se recubren previamente con gelatina al 0,1% durante al menos 20 minutos. De este modo las células madre embrionarias AB1 y las células del carcinoma embrionario F9 y P19 crecen formando colonias de bordes redondeados y de aspecto indiferenciado. Las células centrales de la colonia son pequeñas, redondas y aparecen muy compactadas entre sí. Por el contrario, las células

periféricas tienen citoplasma más abundante y a menudo presentan pequeñas extensiones pseudopódicas. Si el cultivo se deja evolucionar, es frecuente la formación de cuerpos embrioides en suspensión.

Para el **mantenimiento** de los cultivos celulares, se retira el medio de cultivo y se despegan las células de la superficie del frasco mediante una solución de Tripsina al 0,25% y EDTA al 0,2% (Sigma, T4049) cuando las colonias cubren aproximadamente un 70% de la superficie del frasco de cultivo. Previamente se realizan dos lavados con la solución de PBS para retirar los restos de suero y detritus, ya que las proteínas en suspensión pueden interferir con la actividad de la tripsina, centrifugamos la suspensión celular resultante a 250 g durante 5 minutos, se suspendió el pellet resultante para repartir de manera fraccionada en nuevos frascos de cultivo con medio de cultivo fresco por la dilución celular correspondiente.

El **almacenamiento** en contenedores criogénicos de nitrógeno líquido se realiza a través de alícuotas de 1 ml de medio de congelación (SBF puro con DMSO como agente anticongelante al 10%) con una concentración media de  $1-1.5 \times 10^6$  células/ml por criovial (Nunc, ref. 368632). La congelación se realiza de forma progresiva (a razón de un grado por minuto hasta  $-80^{\circ}\text{C}$ ) hasta llegar a la temperatura de  $-190^{\circ}\text{C}$  propia del nitrógeno líquido. De este modo se disminuye el riesgo de daños celulares debidos a la aparición de microagujas cristalinas en el interior celular.

El proceso de **descongelación** de las células se hizo transfiriendo el criovial directamente desde el nitrógeno líquido a un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación depositamos las células en un tubo de 10 ml con medio de cultivo nuevo y las centrifugamos para eliminar el DMSO. El pellet resultante se resuspende en medio de cultivo fresco y transferimos la suspensión celular a un nuevo frasco de cultivo.

Para calcular los porcentajes de células vivas y muertas empleamos una cámara cuentaglobos tipo Bürker (Blaubrand) tiñendo la suspensión previamente con Azul Tripán a una concentración del 0,4%.

### **3.3. CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS MIOIDES PERITUBULARES DE TESTÍCULO DE RATÓN**

Las células mioides peritubulares del testículo proceden de ratones Swiss sexualmente maduros (6-8 semanas de edad). El material quirúrgico se encuentra esterilizado y todo el procedimiento se lleva a cabo en el interior de la campana de flujo laminar, garantizando así el mayor grado de esterilidad posible. Los ratones son sacrificados mediante dislocamiento cervical y la zona de incisión es rociada abundantemente con etanol al 70%. Utilizando unas tijeras quirúrgicas se realiza un corte transversal al eje longitudinal del animal, entre uno y dos centímetros por encima de pene del ratón. De este modo se corta la dermis y se accede al peritoneo el cual también será seccionado. Una vez atravesadas estas dos capas se encuentran las vísceras del ratón; y en la parte inferior de la zona de incisión, se puede observar una capa de tejido adiposo. Al tirar de este cúmulo de grasa, se extraerá el testículo. Durante las incisiones se debe prestar especial atención para evitar cortes en órganos como la vejiga o los intestinos, lo cual aumentaría el riesgo de contaminaciones no deseadas.

Los testículos extraídos se depositan en una placa de Petri (Sarstedt, ref. 83.1801) con PBS + 1% de antibiótico S/P. A continuación se retira la túnica albugínea realizando un pequeño corte en un extremo del testículo y ejerciendo presión en el lado opuesto del mismo. Los túbulos seminíferos saldrán del interior del testículo por la apertura realizada y se depositarán en otra placa de Petri también con una disolución de PBS + 1% de antibiótico S/P.

Una vez obtenidos los túbulos seminíferos los depositamos en un tubo de polipropileno con 20 ml de PBS + 1% antibiótico S/P, a continuación se agitará el tubo suavemente durante unos minutos y se espera a que decanten (1G) los túbulos seminíferos, se elimina el sobrenadante y se repite la operación añadiendo otros 20 ml de PBS + 1% de antibiótico S/P. Tras este segundo lavado, la mayor parte de los componentes del intersticio testicular se habrá eliminado.

Una vez obtenidos los túbulos seminíferos, se describen a continuación las 3 aproximaciones llevadas a cabo para la obtención de células mioides peritubulares (PTC):

### 3.3.1. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE TÚBULOS SEMINÍFEROS

La primera aproximación que se intentó para obtener cultivos de PTCs fue la fragmentación de los túbulos seminíferos del testículo de ratón. Este método fue el más sencillo de llevar a cabo, pero el volumen de cultivos primarios obtenido era muy bajo. Está basado en los métodos por los cuales se realizan biopsias de testículo en diferentes hospitales para el estudio del tejido testicular de pacientes con problemas tales como la azoospermia (Albrecht *et al.*, 2006).

Los túbulos seminíferos se depositan en una placa Petri de 6 cm de diámetro (Sarstedt, ref. 83.1801) con PBS + 1% de antibiótico S/P y bajo condiciones de total esterilidad, se realizan cortes cuya longitud no supere los 3 mm de longitud. Estos pequeños fragmentos son recogidos con mucho cuidado mediante una pipeta *Pasteur* y depositados en nuevas placas Petri de 3 cm de diámetro (Sarstedt, ref. 83.1800). A continuación se añade medio de cultivo fresco y se dejan decantar durante 24 horas para que los fragmentos se adhieran al fondo. Las placas se introducen en el incubador a 21% O<sub>2</sub>, humedad saturada y 5% de CO<sub>2</sub>.

Esta técnica de aislamiento se intentó mejorar fijando directamente los fragmentos de túbulo seminífero al fondo de la placa con una solución de Matrigel<sup>®</sup> (BD 354234) diluida en medio DMEM sin SFB en una proporción 3:1. El Matrigel<sup>®</sup> es una membrana basal solubilizada obtenida a partir del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm y compuesta por laminina, fibronectina y colágeno tipo IV (Fig. 8). Con esta solución de Matrigel<sup>®</sup> se intentaba reproducir la membrana basal sobre la cual se localizan las PTCs en el testículo y por tanto, se pensó que así se facilitarían el aislamiento de estas células, aunque finalmente no se obtuvieron mejoras significativas.

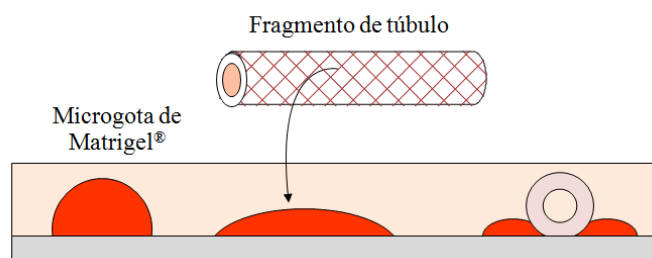


Fig. 8: Dibujo representativo del método de aislamiento de PTC mediante cultivos organotípicos.

### **3.3.2. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y ADHESIÓN DIFERENCIAL**

La obtención de PTCs de testículo de ratón a través de un proceso de digestión enzimática es una adaptación basada en los trabajos previos de aislamiento de células de Sertoli y de las células mioides peritubulares del testículo de rata (Tung & Fritz, 1977; Palombi *et al.*, 1988).

Las células mioides peritubulares se organizan en una monocapa alrededor del túbulo seminífero del ratón, por lo que para obtener un número significativo de células se sacrifican 6 ratones swiss macho en cada proceso de extracción.

Los túbulos obtenidos se sometieron a un tratamiento con 20 ml de Tripsina-EDTA durante 10 minutos en agitación constante a una temperatura de 37°C. Transcurridos este tiempo, la acción de la tripsina se neutraliza con la adición de 5 ml SFB puro a la suspensión de túbulos. Posteriormente, el sobrenadante obtenido se pasa por un filtro de nylon de 100µm (BD Falcon™ Ref. 352360) que se centrifugará a 250 g durante 5 minutos. El pellet resultante se resuspende en medio de cultivo nuevo y se siembra en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> de superficie. Tras 72 horas, se realizarán varios lavados con PBS+1% de antibiótico S/P y se renovará el medio de cultivo. Pasadas 48 horas, se procederá a enriquecer el cultivo primario de células peritubulares mediante su selección por **adhesión diferencial**. Tras retirar el medio de cultivo y despegar las células de la superficie del frasco, se centrifuga la suspensión resultante por el método habitual de cultivo celular. El pellet, una vez resuspendido, se reparte en nuevos frascos de cultivo con medio de cultivo fresco. Pasadas 5 horas se procederá a lavar nuevamente los cultivos para retirar las células no adheridas. Este proceso se repetirá al realizar un nuevo pase cuando los cultivos alcancen la confluencia adecuada para obtener finalmente una riqueza óptima de células mioides peritubulares en nuestros cultivos primarios.

Para comprobar la pureza en PTCs de los cultivos primarios se tomaron como referencia los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia y expresión de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).

### 3.2.2.1. Inmunofluorescencia de $\alpha$ -SMA

Los cultivos procedentes de la extracción en fase 2 se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con gelatina al 0.1%. El ensayo fue llevado a cabo con el anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA, en verde (FITC) y el DNA de las células se tiñó con DAPI, en azul (Fig. 9). Se consideraron células PTC aquellas que resultaron positivas para ambos marcajes.

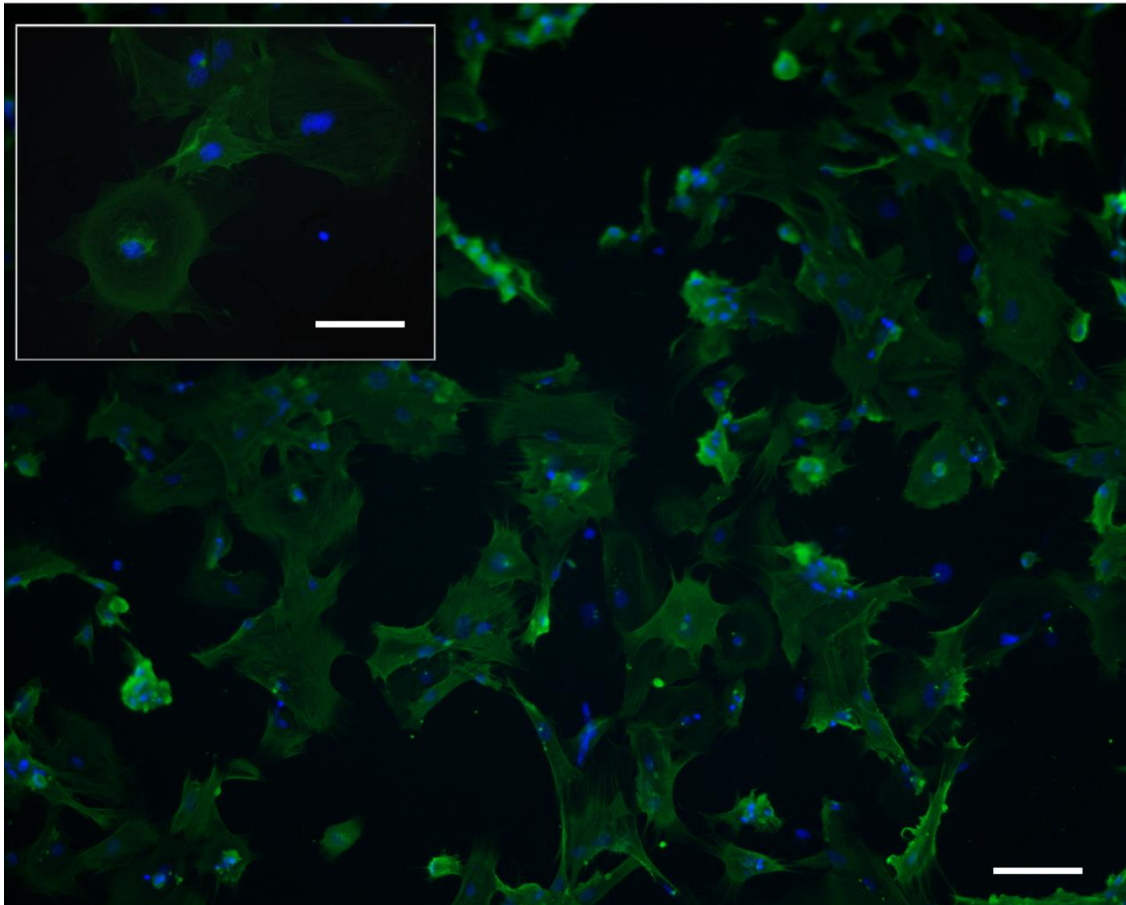


Fig. 9: Citoesqueletos de las células mioides peritubulares positivas para  $\alpha$ -SMA. Ejemplo de uno de los campos donde se llevo a cabo el recuento para estimar la pureza de los cultivos primarios. Barra de escala 200 $\mu$ m. **Arriba a la izquierda:** Detalle de PTCs junto con una célula contaminante de otro tipo celular. Barra de escala 50 $\mu$ m.

Tras realizar el recuento de varios campos procedentes de IFs de diferentes cultivos primarios se contabilizaron 579 células totales de las cuales 440 eran positivas para  $\alpha$ -SMA, por lo que se considera que los cultivos poseen **una riqueza del 76 %** en PTCs.

### 3.3.2.2. Expresión de $\alpha$ -SMA mediante PCR de Célula Única.

Para un análisis más específico de la expresión de  $\alpha$ -SMA por parte de las células presentes en los cultivos primarios se llevó a cabo la técnica de PCR de célula única con 10 células procedentes de 2 cultivos primarios distintos.

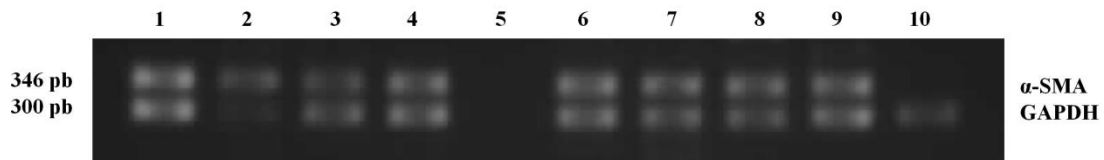


Fig. 10: Muestras de mRNA de células individuales procedentes de cultivos primarios de PTCs. Se consideró que los pocillos en los cuales se expresó  $\alpha$ -SMA que estaban ocupados por una células PTC. El gen constitutivo utilizado para detectar la presencia de células fue el GAPDH.

Tras llevarse a cabo la reacción de PCR, se pudo observar que **8 de 9 reacciones eran positivas para  $\alpha$ -SMA** (Fig.10). En uno de los 10 pocillos la reacción no tuvo lugar o también es posible que se depositara algún fragmento celular que fue confundido con una célula al observar bajo la lupa la suspensión de los cultivos.

### 3.3.3. GRADIENTE DIFERENCIAL DE *PERCOLL*

La última forma ensayada para la obtención de cultivos primarios de células mioides peritubulares está basada en el aislamiento por gradiente diferencial de *Percoll* (Tung & Fritz, 1990). A partir de una solución stock al 90%, se preparan 5 diluciones seriadas de *Percoll* (Sigma<sup>®</sup>, P-1644) desde el 70% hasta el 30% en alícuotas de 2 ml cada una.

Solución stock al 90 % de <i>Percoll</i>
90 ml de <i>Percoll</i> al que se le añaden:
8.64 ml de <i>ten-strength</i> Ca <sup>2+</sup> - Mg <sup>2+</sup> - <i>free Hanks' buffer</i> (HBSS)
1 ml de 10 mM N-(2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) (HEPES)
0.36 ml de HCl 1 N

Cada alícuota es vertida suavemente en un tubo cónico de 15 ml con tapón de rosca comenzando por la dilución más concentrada a la menos concentrada. Sobre la última línea de gradiente (30%) se vierten 2 ml de sobrenadante de células peritubulares del testículo procedente del proceso de aislamiento mediante digestión enzimática.

La columna resultante en el tubo se centrifuga a 750 g durante 30 minutos tras los cuales se observarán las siguientes bandas:

**1ª banda** de 1.05 de densidad + **2ª banda** de 1.06 de densidad contienen células dañadas, células germinales, desechos y alguna célula Sertoli.

**3ª banda**, localizada en la interfase de los gradientes de 40% y 50% de *Percoll* (densidad 1.07) es la que contiene las células mioides peritubulares del testículo.

Se descartó este método ya que se obtuvieron bajas tasas de éxito en el aislamiento y la calidad de los cultivos no era la óptima para una experimentación posterior. Además se recomendaba utilizar ratones inmaduros sexualmente para evitar posibles contaminaciones de células de línea germinal lo cual no era compatible con el nuestro proyecto de investigación

### **3.4. TÉCNICAS DE CO-CULTIVO CELULAR**

Para el estudio de la respuesta por parte de células mioides peritubulares a la presencia de un tumor derivado de células germinales en el testículo, se desarrollaron en el laboratorio 3 modelos *in vitro* que pretendían reproducir un hipotético microambiente tumoral.

#### **3.4.1. CO-CULTIVO CELULAR EN 2D**

##### **3.4.1.1. Co-Cultivo Celular Indirecto**

Para llevar a cabo este método, se sembraron previamente células madre embrionarias (AB1) y células derivadas del carcinoma embrionario (F9 y P19) a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células en frascos de  $25 \text{ cm}^2$  con medio de cultivo completo. Estos cultivos permanecen 48 horas en el incubador a 21%  $\text{O}_2$ , humedad saturada y 5% de  $\text{CO}_2$ . A



continuación, se retira el medio y los cultivos son lavados 2 veces con PBS antes de añadir un volumen de 1.5 ml de medio de cultivo sin SFB. Pasadas 24 horas, se recogen estos medios, se centrifugan a 250 g durante 5 minutos y se filtran (MiliPore® 0.2µm, ref. 83.1826.001) para tratar con ellos lo cultivos primarios de PTC durante 24 horas.

#### **3.4.1.2. Co-Cultivo Celular Directo.**

En esta ocasión  $2.5 \times 10^5$  de células derivadas del carcinoma embrionario (EC) son sembradas directamente sobre monocapas de cultivos primarios de PTCs que actúan en este caso como “*feeder layers*” del co-cultivo. Tras 24 horas en el incubador a 21% O<sub>2</sub>, humedad saturada y 5% de CO<sub>2</sub>, se retira el medio y se lavan los cultivos 2 veces con PBS. Posteriormente se añade un volumen de 1.5 ml de medio de cultivo sin SFB.

En ambos casos, los medios de cultivo sin SFB procedentes de los cultivos de PTC tratados con medios condicionados y los medios procedentes de los co-cultivos de PTC-EC, se vuelven a centrifugar a 250 g durante 5 minutos y se vuelven filtrar antes de ser utilizados directamente o se conservan a -20°C hasta el día de su utilización.

#### **3.4.2. CO-CULTIVO CELULAR EN 3D**

El tercer modelo *in vitro* está basado en los experimentos de cuantificación de la invasión celular en matrices de colágeno tipo I por parte de miofibroblastos del estroma tumoral (Fig. 11):

Se prepara un Erlenmeyer con una suspensión celular de PTCs a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml en un volumen total de 6 ml de medio de cultivo DMEM completo. Es incubado en agitación giratoria constante durante 72 horas a 37° C y 70 rpm en atmosfera húmeda con un 10 % de CO<sub>2</sub>.

Pasado este tiempo se seleccionan con ayuda del microscopio alrededor de 20 esferoides de un diámetro de +/- 150 µm.

Los esferoides elegidos se suspenden en un gel de colágeno tipo I (1 mg/ml) y se reparten en placas de 6 pocillos. Previamente en los pocillos de dicha placa se he polimerizado una capa de colágeno que cubre un cultivo de células EC.

Tras 1 hora a 37° C, la capa de colágeno con los esferoides ha polimerizado sobre la capa de colágeno del cultivo, ambas capas se recubrirán con medio DMEM completo y se tomarán fotos a distintos tiempos para su posterior análisis morfológico.

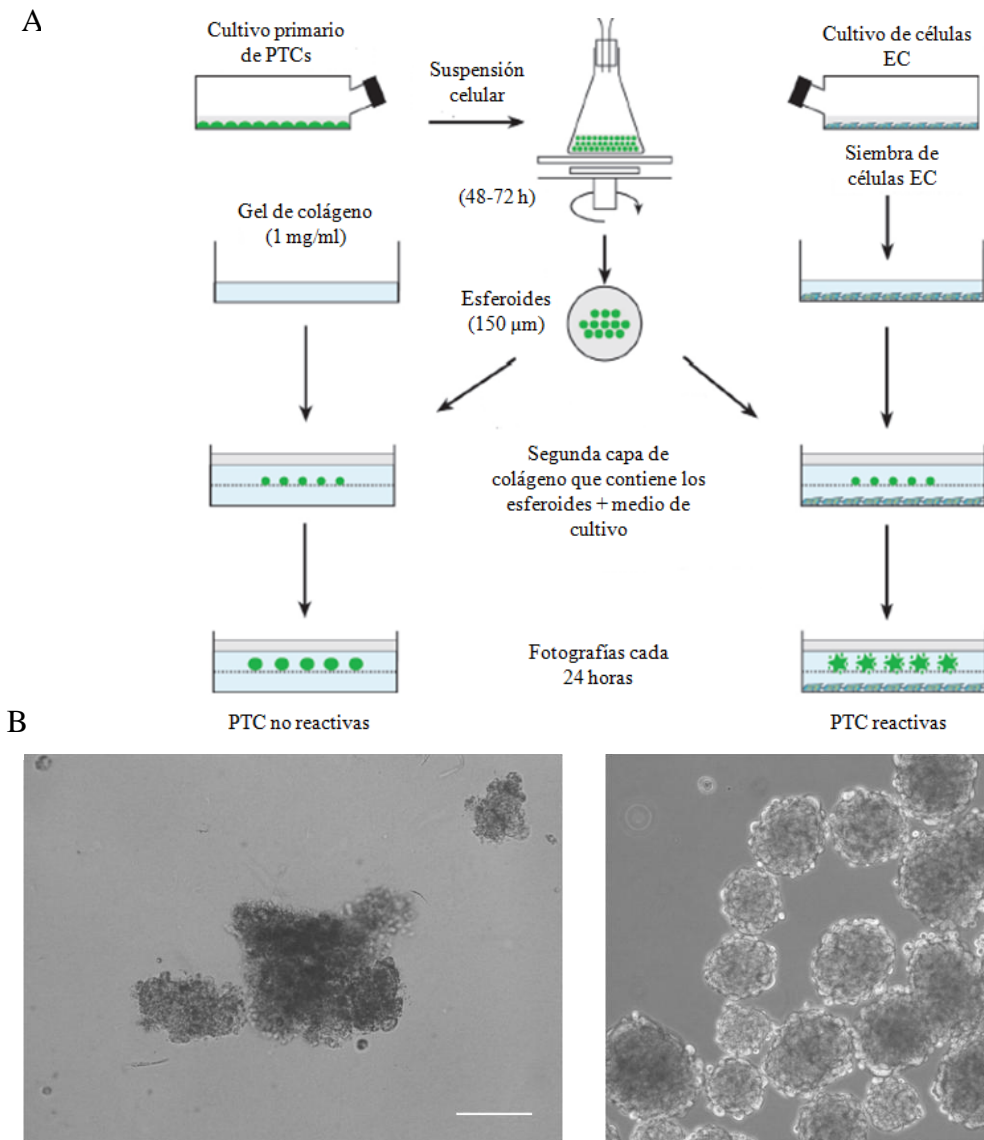


Fig. 11: **Esquema del cultivo celular en 3D.** (A) Adaptación del método utilizado para realizar cocultivos en 3D en matrices de colágeno tipo I (De Wever *et al.*, 2010). (B) Agregados obtenidos con los cultivos primarios de PTC (Izquierda) y con la línea celular de fibroblastos STO (Derecha). Barra de escala 150 µm.

### **3.5. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR**

El ensayo de cierre de “herida” (*wound healing assay*) tiene como objetivo el estudio de la migración celular. Es un ensayo fácil, barato y ampliamente utilizado. Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a la que previamente se le ha realizado una brecha o “herida”. Las células en el borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la “herida”.

Los pasos básicos implican la creación de la “herida” o área libre de células en la monocapa celular, la captura de imágenes de manera periódica durante el experimento y la comparación de todas las imágenes para determinar la velocidad de migración de las células en un espacio de dimensiones conocidas. Este experimento permite analizar tanto la migración de la monocapa como el movimiento de las células individuales.

En nuestro laboratorio realizamos este ensayo tanto con fibroblastos embrionarios de la línea STO como con los cultivos primarios de PTCs. Se realizaron co-cultivos en presencia de células del carcinoma embrionario P19, F9 y células madre embrionarias AB-1 en placas de 6 pocillos (50.000 células/pocillo), así como, tratamientos con los medios condicionados.

Se utilizaron unos insertos de silicona específicamente diseñados para este tipo de experimentos (Ibidi<sup>®</sup> - Cat. N° 80209). Estos insertos permiten ser menos agresivos con el cultivo en monocapa a la hora de generar el espacio (“herida”) cuya distancia al retirarlos es de 500µm.

En cada ranura del inserto se siembra un volumen de 70µl de una suspensión celular (300.000 células/ml), pasadas 24 horas la monocapa de células se habrá adherido al fondo del pocillo y se procede a retirar suavemente con unas pinzas estériles el inserto de silicona (Fig. 12). Se realiza un lavado y se añaden los medios condicionados por las células ES y EC. En los experimentos de co-cultivo celular directo, 48 horas antes de la retirada del inserto, se habrá sembrado alrededor del mismo la población de células ES o EC (50.000 células/pocillo) con la que interaccionarán las células objeto del estudio.

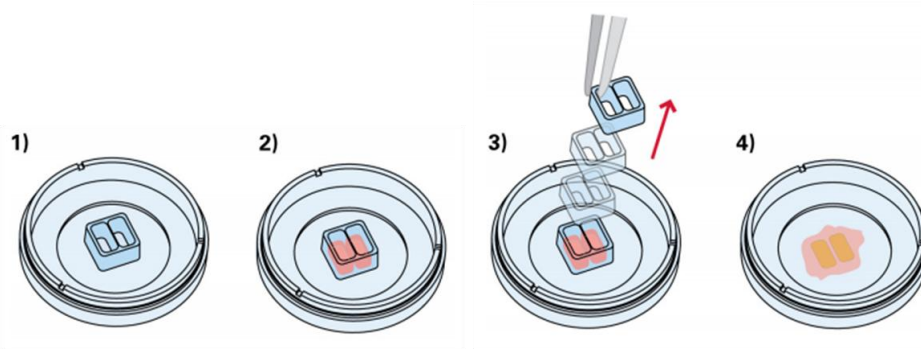


Fig. 12: Esquema representativo del método empleado para los ensayos de migración celular con insertos de silicona. Fuente: [www.ibidi.com](http://www.ibidi.com)

### 3.6. CITOMETRÍA DE FLUJO

El citómetro de flujo es un instrumento que permite analizar las características de una población celular a través de un estudio individualizado de cada elemento. Básicamente, se hace pasar una hilera de células a través del interior de un capilar iluminado por un haz de luz láser de determinada longitud de onda. Una serie de detectores situados alrededor del capilar nos dan una información directa sobre la rugosidad celular (*intensity of side scatter* o ISS) y tamaño celular (*forward angle light scatter* o FALS). Además puede cuantificarse la emisión de fluorescencia, lo cual nos permitió estudiar las fases del ciclo celular de nuestros cultivos.

#### 3.6.1. ANÁLISIS DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR

Para analizar las fases del ciclo de celular tomamos un millón de células, las lavamos con PBS y las fijamos con etanol 70 % (se resuspenden las células en 1 ml de PBS y se añaden lentamente 2.33 ml de etanol 100% frío). Tras 1 hora a 4°C, eliminamos el fijador mediante dos lavados con PBS y marcamos el DNA con yoduro de propidio (IP). El IP es un fluorocromo que se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos de doble hebra lo cual les confiere una fluorescencia 30 veces superior a la de la molécula libre. Esta relación permite establecer una relación directa entre la cantidad de DNA de la célula (y su fase de ciclo celular correspondiente) y la fluorescencia del IP (620 nm). Previamente añadimos RNasa A (250 µg/ml) ya que el IP se une indistintamente al DNA y al RNA y a continuación añadimos 20 µg/ml de IP. Las células se incuban durante 1 hora a 4°C antes de pasarlas por el citómetro de flujo (Galios, Beckman Coulter) para medir su fluorescencia a 620 nm.

### 3.7. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS AB1 CON EL PLÁSMIDO ptdTOMATO-N1

#### 3.7.1. EL PLÁSMIDO ptdTOMATO-N1

El plásmido ptdTomato-N1 es un vector que codifica dímeros en tándem (td) para una proteína roja fluorescente (Fig. 13). Fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Roger Tsien y deriva de un mutante monomérico DsRed por lo que es detectable mediante anticuerpos anti-DsRed. Esta estructura de dímero en tandem proporciona una excepcional señal al tdTomato. Su rango de excitación y emisión máxima ocurre a 554 nm y 581 nm respectivamente, mostrando una excelente fotoestabilidad. Estas características convierten al ptd-Tomato en un plásmido ideal para estudios *in vivo*.

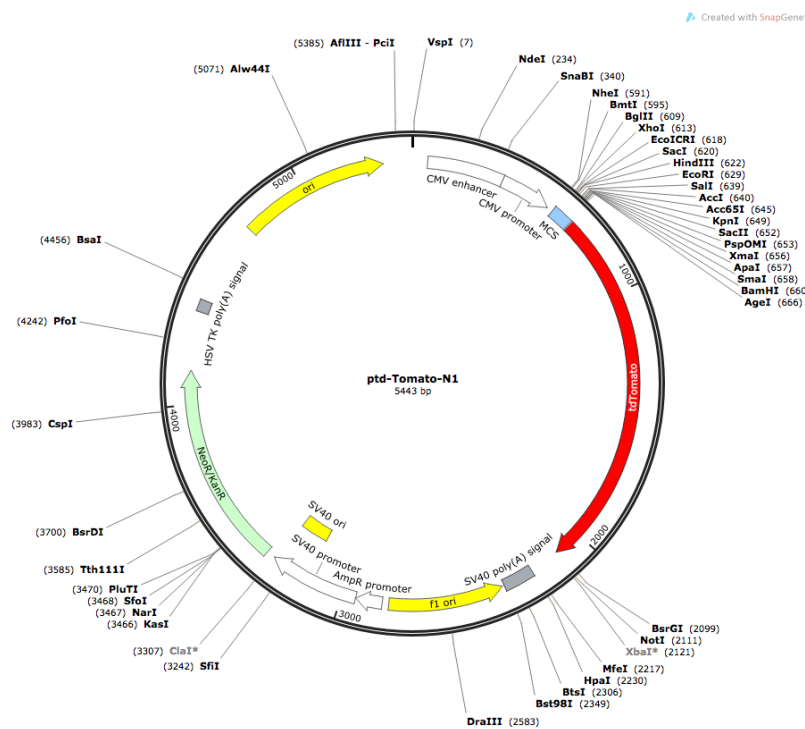


Fig. 13: Esquema del plásmido ptd-Tomato-N1 donde pueden verse sus componentes más importantes. Fuente: [www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)

### **3.7.2. TRANSFECCIÓN MEDIADA POR LIPOSOMAS CATIONICOS**

Para llevar a cabo esta técnica se emplean lípidos catiónicos que poseen una parte hidrofílica y otra hidrófoba. Estos liposomas son capaces de formar complejos electrostáticos con el DNA, protegiéndolo así de la acción de las nucleasas y facilitando su transporte al núcleo celular (Felgner, 1987).

La entrada del complejo DNA-liposoma a través de la membrana plasmática puede tener lugar mediante dos mecanismos:

- a) por endocitosis
- b) por fusión de membranas.

Los liposomas se obtienen mezclando el lípido catiónico con fosfatidilcolina y colesterol, lo cual permite aumentar su estabilidad en disolventes orgánicos. Una vez evaporado el disolvente orgánico, se añade un tampón acuoso y se sonica, para obtener liposomas de varios tamaños.

En la transfección que realizamos se empleó una solución lipídica comercial Xfect mESC específicamente diseñado para células madre embrionarias de ratón (Clontech, Cat. N° 631320) sobre un cultivo de células AB 1 en confluencia (80%) siguiendo las recomendaciones del fabricante (ver Fig. 14 para más detalles):

1. 5 horas antes de la transfección se siembran  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  células en 1 ml de medio de cultivo completo en pocillos previamente tratados con gelatina al 0.2%.
2. Por cada cultivo que se quiere transfectar se prepara una mezcla que contiene 5 µg del plásmido ptdTomato-N1 en 100µl de buffer + 2.5 µl del polímero mESC en 97.5 µl de buffer.
3. Se añade la mezcla gota a gota y se incuba la placa a 37° C durante 3 horas.
4. Se realiza un lavado del cultivo y se renueva el medio de cultivo diariamente

Una vez establecida la transfección, realizamos con los cultivos la técnica de **dilución límite** que consiste en la realización de diluciones sucesivas de una suspensión celular, hasta conseguir una alícuota que contenga una sola célula en placas de 96 pocillos (Sarstedt, ref. 83.1835) con el fin de aislar células fluorescentes a partir de las cuales

cultivamos la línea celular de AB1<sup>tomate</sup> con ayuda del antibiótico de selección G418 (Gibco®) en el medio de cultivo.

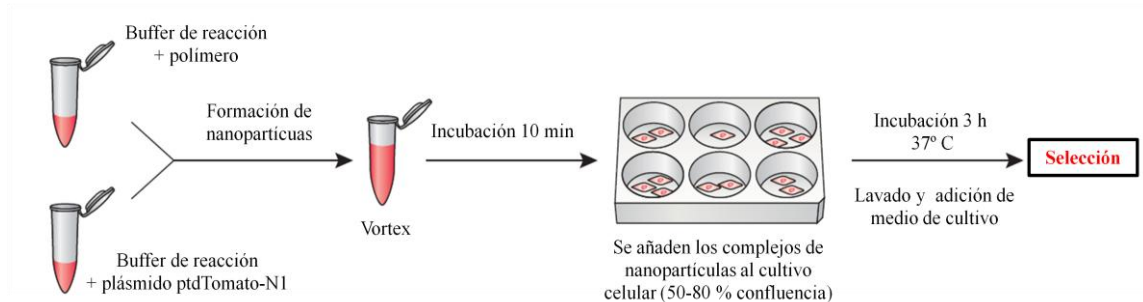


Fig. 14: Dibujo explicativo del método de transfección llevado a cabo con las células Ab1 y el plásmido ptdTomato-N1. Fuente: [www.clontech.com](http://www.clontech.com)

### 3.8. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

#### 3.8.1. SOLUCIONES EMPLEADAS

<b>Fijador de Bouin:</b>
70 % de una solución saturada de ácido pícrico
25 % formaldehído
5 % de ácido acético glacial
Añadimos agua bidestilada hasta completar el volumen total

#### 3.8.2. FIJACIÓN, INCLUSIÓN Y TINCIÓN DE LOS TEJIDOS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

La **fijación** de las muestras de testículo de ratón se llevó a cabo en líquido Bouin entre 6 y 12 horas a temperatura ambiente.

Para su **inclusión** en parafina se utilizó el procesador de tejidos *Citadel-1000* (Shandon) con los intervalos estándar: una hora y media en alcoholes de hidrofobicidad creciente (Etanol 50, 70, 96 y 100%), benzoato de metilo y citrosol. Una vez terminado el programa de fijación, las muestras se depositan en parafina fundida a partir de las cuales elaboraremos los bloques en los moldes dispuestos para tal uso, orientando las muestras

dentro del molde para facilitar el posterior corte en el micrótopo de cuchillas desechables (Shandon, AS325) una vez enfriada la parafina. Las secciones realizadas eran de 5-8  $\mu\text{m}$ , recogiénolas en portaobjetos de cristal.

La **tinción** de los cortes se realizó a través del programa del equipo *Shandon Varistain* (ThermoFisher- Scientific) con el cual se desparafinan y se hidratan las muestras haciéndolas pasar de manera automática por una batería de soluciones de hidrofobicidad decreciente (Citrosol, Etanol 100, 96, 70 y 50% y finalmente agua). La tinción de Hematoxilina de Harris (Shandon, 9990154) se realizó en una solución a saturación durante 2,5 minutos y la posterior tinción con Eosina (Shandon, 9990167) durante 25 segundos.

Por último se volvieron a deshidratar las muestras con un proceso inverso al anterior y sellamos las preparaciones con un cubreobjetos y medio de montaje DPX (Fluka, 44581)

### **3.8.3. CORTES HISTOLÓGICOS DE CRIOSTATO**

Las muestras que se destinaron para cortes histológicos al criostato se fijaron previamente durante 12 horas en paraformaldehído al 4% en PBS. Después las sumergimos en sacarosa al 30% en agua durante 6 horas, lo cual evita la formación de cristales de hielo que pueden dañar las estructuras celulares durante el proceso de congelación

A continuación las muestras se incluyen en resina *Tissue-Tek* (O.C.T. Compound, Sakura) y las conservamos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La microtomía de las muestras se realiza con la cámara fría programada a una temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$  y el portamuestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el Ultramicrotopo LEICA ULTRACUT UCT. Los cortes son de 8  $\mu\text{m}$  de grosor se recogen en portaobjetos previamente tratados con polilisina diluida en agua (1:10). Finalmente estas muestras son guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la inmunohistoquímica.



### **3.8.4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

#### **3.8.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido**

Los túbulos seminíferos se fijaron con 2% glutaraldehído en tampón Cacodilato 0.1 M a pH=7.4, 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente.

El fijador se lavó con tampón Cacodilato + Sacarosa isosmolar (normalmente entre 4-8% sacarosa) durante 10 minutos (x3) y se las muestras se postfijaron con 1% OsO<sub>4</sub> en Cacodilato, durante 1 hora en oscuridad a 4 °C. Pasado este tiempo el OsO<sub>4</sub> se lava con el tampón Cacodilato 10 min (x3).

La muestra se deshidrata en serie creciente de etanol (30, 50, 70, 90, 96, 100% y 2 veces en 100 absoluto) a intervalos de 10 minutos en cada serie. Finalmente se realizaron dos lavados en hexametildisilazano durante 15-30 minutos, dejándose secar las muestras al aire.

Para colocar las muestras en los soportes del microscopio electrónico de barrido se utiliza cinta adhesiva de carbono y se recubren con una capa de 20 nm de oro en un recubridor de plasma con atmósfera de Argón (JEOL, JSC-100). Para la observación y captura de imágenes se utilizó un SEM HITACHI S3400N.

#### **3.8.4.2. Microscopía Electrónica de Transmisión**

Para la observación de túbulos seminíferos a TEM se prepararon muestras no mayores de 1 mm<sup>3</sup> y se fijaron con 2% glutaraldehído en tampón Cacodilato 0.1 M a pH=7.4, durante 4 h a T<sup>a</sup> ambiente.

En el caso de los cultivos primarios de células mioides peritubulares es necesario fijar previamente con glutaraldehído el cultivo, levantar la monocapa con una espátula de silicona estéril (Corning<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich) y centrifugar a bajas rpm las células para conseguir un pellet que se fijará completamente.

Los lavados del fijador se realizaron con tampón Cacodilato + Sacarosa isosmolar (normalmente entre 4-8% sacarosa) durante 10 minutos (x3). Las muestras se postfijaron con 1% OsO<sub>4</sub> (Sigma<sup>®</sup>, O5500) en tampón Cacodilato durante 1 hora en oscuridad a 4 °C. Pasado este tiempo, el OsO<sub>4</sub> se lava con el tampón Cacodilato 10 minutos (x3).

Las muestras se deshidratan en series crecientes de etanol (30, 50, 70, 90, 96, 100% y 2 veces en 100 absoluto) a intervalos de 15 minutos en cada serie. A continuación sumergimos las muestras en óxido de propileno (Fluka, 82325) y en mezclas de óxido de propileno con resina EPON (2:1, 1:1 y 1:2) y finalmente en resina pura epoxi EPON (BioRad, Polarbed 812). La polimerización se llevó a cabo durante 48 horas en una estufa a 60°C. Finalmente se realizaron cortes semifinos (1-3 µm de grosor) de los bloques obtenidos, y ultrafinos (50-100 nm de grosor) para contrastarlos con acetato de uranilo (Merck, 8473) y citrato de plomo.

La visualización y fotografía de dichos cortes se realizó en un microscopio electrónico PHILIPS EM208S con cámara digital Morada y PHILIPS CM120 Biofilter con módulo STEM y mapeo elemental y filtrado de imágenes mediante EELS a una tensión de 80kV.

### **3.9. TÉCNICAS HISTO Y CITOQUÍMICAS**

La inmunohistoquímica permite demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes (o no fluorescentes) que se unen específicamente a los correspondientes antígenos.

#### **3.9.1. INMUNOHISTOQUÍMICA SOBRE CORTES DE CRIOSTATO DE MATERIAL CONGELADO**

En primer lugar se retira la resina *Tissue-Tek*, sumergiendo los cortes en PBS durante 10 minutos. A continuación se fijan químicamente las secciones en acetona fría durante 10 minutos a 4°C y eliminamos los restos del disolvente sumergiendo los portaobjetos en PBS 10 minutos.

El bloqueo de la muestra la llevamos a cabo con suero bovino fetal al 5% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación añadimos el anticuerpo a su concentración adecuada.

La incubación se realiza durante 12 horas a 4°C, tras las cuales se retiran los restos del anticuerpo con 2 lavados de PBS de 5 minutos cada uno. Finalmente se añade el

anticuerpo secundario junto con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a concentración de 0.04 µg/ml. Una hora después se retira el anticuerpo secundario y se procede a montar la muestra con medio de montaje Fluoromount G (EMS, Cat. 17984-25).

Los portaobjetos se guardarán en oscuridad a 4° C hasta el momento de su observación y fotografía en el microscopio de fluorescencia ZEISS AXIOSKOP o en el microscopio confocal OLYMPUS FLUOVIEW FV500.

### **3.9.2. INMUNOCITOQUÍMICA SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS MIOIDES PERITUBULARES**

Tras cultivar las células mioides peritubulares sobre cubreobjetos de cristal previamente tratados con gelatina al 0.1 % (Calbiochem<sup>®</sup>, ref 345808)). Se retira el medio de cultivo con varios lavados de PBS.

Se fijan los cultivos con paraformaldehído al 4% durante 1 hora a 4°C y eliminamos los restos del fijador lavándolos 10 minutos en PBS varias veces.

El bloqueo y la permeabilización de la muestra la llevamos a cabo en una solución con albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma<sup>®</sup>, ref. A-7030) al 5% y Tritón X-100 (Sigma<sup>®</sup>, ref. T8787) al 0,5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación añadimos el anticuerpo primario que se incubará a 4°C durante 12 horas.

Pasado este tiempo se retiran los restos de anticuerpo primario con dos lavados en PBS de 5 minutos y añadimos el anticuerpo secundario a su concentración correspondiente en una solución de BSA al 5% en PBS.

Se realizan una serie de lavados en PBS de los cuales, el último contiene DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a concentración de 0.04 µg/ml. Pasados 10 minutos, se retira el fluorocromo y se montan las muestras con medio de montaje Fluoromount G (EMS, Cat. 17984-25)

Al igual que en la inmunohistoquímica sobre cortes de criostato, los portaobjetos se guardarán en oscuridad a 4° C hasta el momento de su observación y fotografía en el

microscopio de fluorescencia ZEISS AXIOSKOP, el microscopio estereoscópico de fluorescencia NIKON AZ100 o el microscopio confocal OLYMPUS FLUOVIEW FV500).

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Huésped</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución de uso</b>
$\alpha$ -Actina de Músculo Liso	Ratón	Sigma <sup>®</sup> A 2547	1:400/1:800
MMP-9	Conejo	Ab137867	1:250/1:500
TNF-alpha	Conejo	Sigma 4502982	1:100/1:500
<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Huésped</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución de uso</b>
Anti-Ratón FITC	Cabra	SC - 2079	1:100/1:400
Anti-Rabbit PE	Cabra	SC – 3768	1:300
Anti-Rabbit Alexa Fluor (555)	Cabra	A-21429	1:1000

Tabla 2: Anticuerpos empleados

### **3.9.3 CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE COLORIMETRÍA**

La viabilidad celular la medimos empleando la técnica del MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], Sigma M2128), que está basada en la capacidad de la enzima mitocondrial deshidrogenasa de las células viables de oxidar los anillos de tetrazolium del MTT, de color amarillo claro, formando cristales de formazán, de color azul intenso. La membrana celular es impermeable a estos cristales y por lo tanto se acumulan en el interior de las células sanas. El número de células viables es directamente proporcional a la concentración de formazán producido. La solución de MTT se emplea a una concentración de 5 mg/ml en PBS y se conserva a 4°C resguardado de la luz.

Antes de realizar el experimento, se realiza una curva de calibración que relacione un número de células variable con la absorbancia obtenida en el lector de placas ((BioTek Synergy HT, BioTek® Instruments).

La estimación del crecimiento celular se realizó cultivando 150.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos (0.32 cm<sup>2</sup>/pocillo), en los cuales se añadió MTT dejando pasar intervalos de 24 horas siguiendo este protocolo:

- a) En primer lugar, se sustituye el medio de cultivo por 100 µl de medio de cultivo sin suero, al que se añade 10 µl de la solución stock de MTT.
- b) Se incuban las células 3 horas en presencia de esta solución y posteriormente se aspira con cuidado de no eliminar células del cultivo.
- c) A continuación se añaden 100 µl de DMSO en cada pocillo de la placa para disolver los cristales, se agita la placa y se procede a la lectura de la absorbancia de la solución obtenida a 540 nm.

Finalmente, mediante la recta de calibración pudo relacionarse la absorbancia de cada muestra con el número de células presentes en cada pocillo.

### **3.10. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS**

#### **3.10.1. EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA DE CULTIVOS CELULARES:**

Debido a que el RNA es una molécula muy sensible a la actividad de RNasas, durante todo el proceso se utilizaron guantes y material libre de RNasa. Así mismo, las soluciones que se prepararon en el laboratorio se hicieron con agua destilada estéril, tratada previamente con Dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma®, D-5758). El DEPC es un agente alquilante altamente reactivo que inactiva las RNasas.

Dada la limitación que supone trabajar con cultivos primarios, el **aislamiento** y **purificación** de RNA de PTCs se realizó con el *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Cat, N° 74104) siguiendo las indicaciones del fabricante. La eficacia de este *kit* radica en la unión selectiva de RNA a membranas de silica-gel, aislando todas las moléculas de RNA superiores a 200 pb.

La **determinación de la cantidad y la pureza del RNA aislado**, se obtuvo con la ayuda del lector de placas (BioTek Synergy HT, BioTek<sup>®</sup> Instruments) utilizando 2  $\mu$ l del RNA de la muestra en cada lectura de la placa (Micro-Volume Plate Take 3<sup>™</sup>, BioTek<sup>®</sup> Instruments). Con ayuda del software asociado (Gen 5<sup>™</sup> Versión 1.11-Take3 *session*) se obtuvo la concentración del ácido nucleico en ng/ $\mu$ l así como el cociente de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$ . Este cociente indica la pureza de los ácidos nucleicos presentes en la muestra. Si dicho valor está entre 1.8 y 2.0, la pureza se considera elevada.

La **síntesis de cDNA (Retrotranscripción)** es un proceso por el cual se obtiene DNA mediante la síntesis de una hebra complementaria al RNA de la muestra por medio de la enzima transcriptasa inversa. El cDNA obtenido constituye el molde necesario para la posterior ampliación exponencial de una secuencia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Previamente, en el proceso de aislamiento del RNA, las muestras son tratadas con DNasa I (RNase-Free DNase Set; Quiagen, Cat. N° 79259) para eliminar la posible contaminación de DNA genómico y evitar así la aparición de falsos positivos. En esta ocasión se empleó el sistema *iScript<sup>™</sup> cDNA Síntesis Kit* (Bio-Rad, 170-8890) que se basa en una enzima derivada del transcriptasa inversa MMLV. Por cada  $\mu$ g de RNA se emplearon 4  $\mu$ l de *iScript Reaction Mix 5x*, que es una mezcla de oligo(dT) y hexámeros aleatorios, 1  $\mu$ l de *iScript Reverse Transcriptase*, que incluye la transcriptasa inversa junto con inhibidores de RNasas y la mezcla completa con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20  $\mu$ l.

Esta mezcla se realiza en tubos para PCR (Sarstedt, ref. 72.737) y se introducen en el termociclador Thermal Cycler C1000 de Bio-Rad programado para que las muestras estén 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y finalice a 4°C.

Las muestras se conservarán a -20°C para ser utilizadas el día de la amplificación.

### **3.10.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La amplificación de las secuencias de material genético mediante ciclos de temperatura es una técnica muy sensible que se basa en la alta estabilidad térmica de las polimerasas de ciertas bacterias extremófilas frente a la sensibilidad térmica a la desnaturalización por calor de las dobles hebras de DNA.

### 3.10.2.1. PCR Convencional

Por cada 1  $\mu$ l de DNA se añadieron 12.5  $\mu$ l de la mezcla comercial ImmoMix™ Red (Bioline, ref. BIO-25022), 1  $\mu$ l de cada pareja de primers (10  $\mu$ M) correspondientes a los extremos de la secuencia a amplificar (Tabla 5) y 10.5 de agua DEPC.

A continuación se aplicó el siguiente programa de temperaturas para la amplificación del cDNA:

CICLO	REPETICIONES	PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	1	1.Desnaturalización	95 °C	10 minutos
2	35	1.Desnaturalización	95 °C	30 segundos
		2.Hibridación	Específica para cada pareja de <i>primers</i>	30 segundos
		3.Elongación	72 °C	30 segundos
3	1	1.Elongación	72 °C	10 minutos
		2.Reposo	4 °C	$\infty$

Tabla 3: Programa de amplificación de cDNA mediante PCR convencional.

### 3.10.2.2. PCR de Célula Única

Para poder llevar a cabo esta técnica se utilizó el sistema AmpliGrid desarrollado por Olympus que consiste en una placa parecida a los portas de microscopía, donde se depositan hasta un número máximo de 48 muestras cuya función es de soporte para realizar amplificaciones de PCR con gran eficiencia. Los “pocillos” donde deben ser colocadas las muestras tienen una parte hidrofóbica externa y una región hidrofílica interna. De este modo, las reacciones permanecerán en el centro. Para que no haya evaporaciones, se cubre cada muestra con una gota de aceite mineral.

El pellet resultante después de despegar y centrifugar un cultivo primario de células mioideas peritubulares se resuspende en PBS (0.5X) y se deposita en una placa Petri de 6 cm de diámetro. Con una pipeta de control bucal, se procede a seleccionar una a una las células bajo un microscopio estereoscópico (Leica Wild M10) para depositarlas en los pocillos de la placa donde se va a realizar la reacción. Una vez evaporado el PBS a temperatura ambiente, se añade en cada pocillo la mezcla resultante de los componentes

proporcionados por el kit de *Single Cell One-Step RT-PCR System* (Fig. 9) junto con los *primers* correspondientes (20µM cada uno).

Para evitar la evaporación de las gotas donde se van a producir la amplificación de cada célula, cada pocillo se recubre por una gota de 5µl de aceite mineral.



<b>Master mix:</b>	<b>B</b>
2x Single Cell RT Reaction Buffer	0.5 µl
RNase Inhibitor (10U/µl)	0.02 µl
2x Single Cell RT Reaction Enhancer	0.15µl
Primer mix (20 µM each)	0.01-0.03µl
Single Cell RT Enzyme Mix	0.04
Nuclease free water	hasta 1 µl
<b>Volumen Total/pocillo</b>	1 µl

<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Tiempo</b>	<b>C</b>
37 °C	15 min	RT-PCR + digestión DNasa I
75 °C	5 min	
42 °C	10 min	<i>One-Stept</i> RT-PCR
50 °C	10 min	
58 °C	30 min	
95 °C	10 min	
94 °C	30 seg	
55 °C – 60 °C	45 – 75 seg	35 – 45 ciclos
72 °C	45 – 75 seg	
72 °C	10 min	
<b>Temperatura ambiente</b>	∞	

Fig. 15: **PCR de Célula Única** (A) Termociclador AmpliGrid ASC200D de Olympus Life Science. (B) Componentes del master mix para realizar la RT-PCR de célula única. (C) Condiciones térmicas del programa de amplificación utilizado.



### 3.10.2.3. PCR Cuantitativa (Q-PCR)

El cDNA obtenido a partir del RNA extraído de los cultivos primarios de PTCs se empleó también para el análisis cuantitativo de la expresión de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 en los cultivos de PTC control y en los cultivos de PTC tratados con medio condicionado por células EC mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

La mezcla para cada reacción contenía 7 ng/μl de cDNA, una mezcla de primers (forward y reverse) a 6.5 μM, 10 μl de *iQ SYBr Green Supermix PCR Reagent kit* (Applied Biosystem) en un volumen final de 20 μl.

El SYBR-Green es un fluoróforo específico de DNA bicatenario que se una con gran afinidad al surco menor de la doble hebra, aumentando su fluorescencia 1000 veces.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los datos de expresión se han obtenido a partir de tres ensayos independientes. Cada ensayo incluía controles negativos sin cDNA.

El experimento se llevó a cabo en el detector ABI/PRISM 7900(Applied Biosystems) donde se generaron y recogieron los datos para su posterior análisis estadístico.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

CICLO	REPETICIONES	PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	1	1.Desnaturalización	95 °C	4 minutos
2	50	1.Desnaturalización	95 °C	30 segundos
		2.Hibridación	55 °C	30 segundos
		3.Elongación	72 °C	30 segundos
3	1	1.Elongación	72 °C	10 minutos
		2.Reposo	4 °C	∞

Tabla 4: Programa de amplificación de cDNA mediante Q-PCR

Junto con la expresión de MMP-2 y MMP-9 se analizó también el gen control (*housekeeping*) RPL-13 para la posterior normalización de los datos.

<b>Primers usados:</b>	<b>Secuencia</b>		<b>Tm (°C)</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<i>α-Actin SM</i>	Fw	CCAGTCGCTGTCAGGAACCCT	58	346
	Rv	TGCTCTTCAGGGGCCACACG		
RPL13	Fw	CCGAAGAAGGGAGACAGTTCTGCTG	58	149
	Rv	CGGAGACTGGCAAAAGCCTTAAAGT		
GADPH	Fw	GGGAAACTGTGGCGTGAT	58	300
	Rv	AAAGGTGGAGGAGTGGGT		
TIMP-1	Fw	CATGGAAAGCCTCTGTGGATATG	57	546
	Rv	AAGCTGCAGGCACTGATGTG		
TIMP-2	Fw	CCAGAAGAAGAGCCTGAACAA	57	994
	Rv	GTCCATCCAGAGGCACTCATC		
TIMP-3	Fw	GGCCTCAATTACCGCTACCA	50	108
	Rv	CTGATAGCCAGGGTACCCAAAA		
TIMP-4	Fw	TGCAGAGGGAGAGCCTGAA	50	112
	Rv	GGTACATGGCACTGCATAGCA		
MMP-1	Fw	GTCTTTGAGGAGGAAGGCGATATT	50	135
	Rv	AGTTAGGTCCATCAAATGGGTTGTT		
MMP-2	Fw	AACTACGATGATGACCGAAGTG	60	80
	Rv	TGGCATGGCCGAACTCA		
MMP-3	Fw	GGAAATCAGTTCTGGGCTATACGA	50	82
	Rv	TAGAAATGGCAGCATCGATCTTC		
MMP-7	Fw	GCAGAATACTCACTAATGCCAAACA	55	88
	Rv	CCGAGGTAAGTCTGAAGTATAGGATACA		
MMP-8	Fw	GATTCAGAAGAAACGTGGACTCAA	60	112
	Rv	CATCAACGCACCAGGATCAGT		
MMP-9	Fw	CGAACTTCGACACTGACAAGAAGT	50	90
	Rv	GCACGCTGGAATGATCTAAGC		
MMP-11	Fw	ATTGATGCTGCCTTCCAGGAT	55	117
	Rv	GGGCGAGGAAAGCCTTCTAG		
MMP-13	Fw	GGGCTCTGAATGGTTATGACATTC	55	114
	Rv	AGCGCTCAGTCTCTTCACCTCTT		
MMP-14	Fw	AGGAGACAGAGGTGATCATCATTG	50	110
	Rv	GTCCCATGGCGTCTGAAGA		

Tabla 5: Secuencia de los *primers* empleados para la amplificación por PCR

### **3.10.3. ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS EN LA PCR CONVENCIONAL Y EN LA PCR DE CÉLULA ÚNICA**

Los productos amplificados mediante PCR convencional y PCR de célula única se hicieron migrar en un gel de agarosa al 1% en TBE. El marcador de pesos moleculares empleado fue Hyper Ladder IV (Bioline, ref. 33029). Conectamos la cubeta de electroforesis a una fuente eléctrica con tensión constante de 90 V durante aproximadamente 45 minutos.

Una vez detenida la electroforesis, los productos amplificados se visualizan en el documentador de geles G:Box de la casa Syngene con la ayuda del software asociado GenSnap (versión 7.05.02)

### **3.10.4. ZIMOGRAFÍA**

La zimografía es una técnica cromatográfica empleada en la detección de proteasas mediante el uso de geles de poliacrilamida a los que se les añade una proteína que actúe como sustrato. En nuestros experimentos añadimos gelatina con el fin de detectar las gelatinasas MMP-2 y MMP-9. Al teñir los geles con azul de *Coomasie* se observan banda sin teñir debido a la degradación de la gelatina del gel llevada a cabo por las gelatinasas presentes en el medio (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1994)

En este ensayo se utilizaron los medios de cultivo procedentes de células PTC, células EC y ES, cultivos de PTC tratados con medios condicionados por células EC y ES, así como co-cultivos celulares de PTC con células EC.

Los frascos empleados eran de 25 cm<sup>2</sup>, sembrando el mismo número de células en cada cultivo. Estos cultivos se lavaron dos veces con PBS y se mantuvieron 24 horas en cultivo en 1.5 ml de DMEM sin suero.

Este medio se procesó de la siguiente manera:

- a) Se recogieron los medios y se centrifugaron a 250 g durante 5 minutos para retirar los restos celulares.
- b) El sobrenadante obtenido se filtra a través de filtros de celulosa con un tamaño de poro de 0.22 µm de diámetro (MiliPore<sup>®</sup>, ref. 83.1826.001). Si el medio se

utiliza directamente se conserva a +4° C, si no conservará a -20° C hasta el día de la electroforesis.

- c) A la hora de cargar el gel, se mezclaron 20 µl de medio condicionado por los cultivos y 10 µl de tampón de carga.

En cada gel de poliacrilamida al 10 % y 0.1 % de gelatina se cargaron 25 µl de muestra por calle del gel. La electroforesis del gel se realizó a 200 V, una vez migradas las muestras, los geles se lavan 2 veces durante 30 minutos con Tritón X-100 al 2% para retirar el SDS presente en los geles, después se realiza un lavado de 5 minutos con agua destilada y se sumergen los geles en *MMP substrate buffer* para ser incubados al menos 12 horas a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación, los geles se lavan en agua destilada durante 5 minutos y se tiñen con azul de *Coomasie* alrededor de 20 minutos, Finalmente los geles se destiñen hasta que aparezcan las bandas con una solución desteñidora. Las fotografías se toman en el documentador de geles G:Box de la casa Syngene y el programa GenSnap (versión 7.05.02).

### **3.10.5. ELISA**

La técnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es un inmunoensayo en el cual un antígeno inmovilizado es detectado mediante un anticuerpo que se encuentra enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, por ejemplo colorantes que permiten medir de manera indirecta mediante espectrofotometría el antígeno presente en la muestra.

Para detectar la concentración presente de la molécula *Tumor Necrosis Factor – alpha* (TNF- $\alpha$ ) en los medios procedentes de los monocultivos de células PTC y células EC, cultivos de PTC tratados con medios condicionados por las células ES y viceversa, así como de los medios procedentes de co-cultivos de ambas líneas usamos el kit comercial *Mouse TNF- $\alpha$*  de la casa Invitrogen<sup>TM</sup> (Life Technologies, Cat N° KMC3011).

Los medios fueron centrifugados para retirar los restos celulares y filtrados a través de filtros de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro (MiliPore<sup>®</sup>, ref. 83.1826.001) antes de realizar el experimento.

El protocolo se explica de manera general a continuación (ver Figura 16):

En cada pocillo de la placa del kit se encuentra adherido un anticuerpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  que inmoviliza el TNF- $\alpha$  presente en las muestras durante una primera incubación. Este TNF- $\alpha$  es detectado posteriormente por un anticuerpo secundario que se encuentra conjugado con biotina. Una vez retirado el exceso de anticuerpo secundario, se añade la enzima Streptavidina-Peroxidasa que se une al anticuerpo secundario y tras una segunda incubación y lavado el exceso de enzima, se añade una solución sustrato de la enzima que producirá color.

La intensidad del color, medida a 450 nm fue medida con el lector de placas (BioTek Synergy HT, BioTek<sup>®</sup> Instruments, programa Gen 5<sup>TM</sup> Versión 1.11), siendo directamente proporcional a la concentración de TNF- $\alpha$  presente en el medio de cultivo.

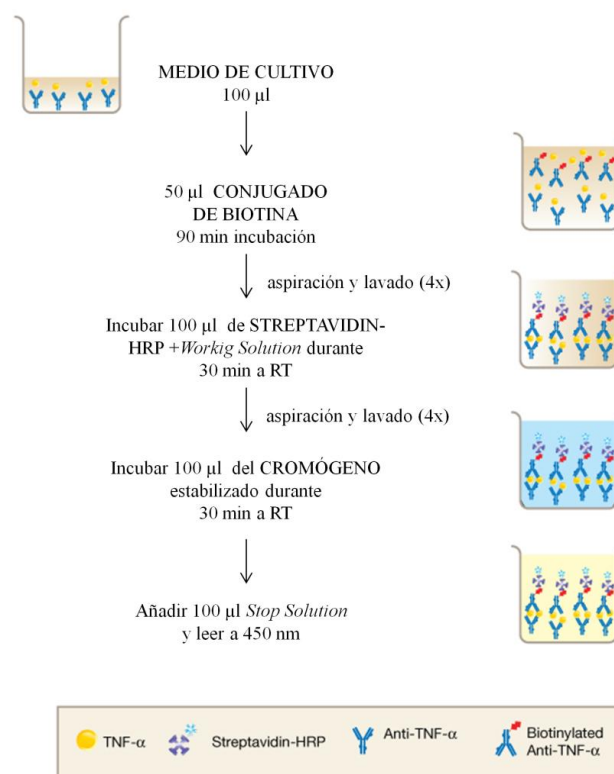


Fig. 16: Principales pasos realizados durante el ensayo de ELISA con medios de cultivo (Adaptación del protocolo *Mouse TNF- $\alpha$  KMC3011* de Invitrogen<sup>TM</sup>).

## 3.10.6. SOLUCIONES EMPLEADAS EN LAS TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

<b>PBS</b>
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>pH: 7.2-7.4</b>

<b>TBE</b>
Tris 89 mM
EDTA 2 mM
Ácido Bórico 89 mM
<b>pH: 8.3</b>

**Gel para zimografía de gelatina**

<i>Running gel</i>
1.8 ml Agua destilada
0.6 ml Gelatina al 1%
1.98 ml Acrilamida al 30%
1.5 ml Tris 1.5M pH 8.8
60 µl SDS al 10%
60 µl APS 10 %
3 µl TEMED

<i>Stacking gel 4%</i>
2.04 ml Agua destilada
498 µl Acrilamida al 30%
378 µl Tris 0.5M pH 6.8
30 µl SDS al 10%
30 µl APS 10 %
3 µl TEMED

<i>Solución de Azul de Coomassie</i>
200 ml Metanol
50 ml Ácido acético
0.5 g <i>Coomassie blue</i> R250
350 ml H <sub>2</sub> O

<i>MMP substrate buffer</i>
6.06 g Tris
1.47 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
0.2 g NaN <sub>3</sub>
Disolver en 800 ml H <sub>2</sub> O. Ajustar el pH a 7.5 y completar con H <sub>2</sub> O hasta 1 l. Mantener a 4°

### **3.11. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS**

Los ensayos in vivo con ratones P129 se basan en la microinyección de células madre embrionarias en el interior de los túbulos seminíferos para el estudio de los tumores testiculares derivados de células germinales (Silván *et al.*, 2011). En nuestro caso prestamos especial atención al estroma testicular, más concretamente a la capa de células mioides peritubulares que rodean el túbulo seminífero en un hipotético estado intermedio dentro del proceso de invasión tumoral

#### **3.11.1. TRASPLANTE CELULAR EN LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS**

##### **3.11.1.1. Preparación de las Agujas y Anestesia del Animal.**

Las agujas utilizadas se elaboraron a partir de capilares de borosilicato (*Clarck Electromedical Instruments*, GC120F-10) de 1 mm de diámetro, mediante un estirador de pipetas (*David Kopf Instruments*, Model 750) a través del cual obteníamos un grosor en la punta de entre 30 y 80  $\mu\text{m}$ . Para facilitar la penetración del capilar en el tejido, se trataba de conseguir una orientación biselada en la punta. El borosilicato tiene la ventaja de ser un tipo vidrio más flexible que otros materiales, por lo que se consigue una reducción en el número de rupturas de estos capilares durante el proceso de microinyección.

Los animales fueron anestesiados mediante la mezcla anestésica Ketamina + Xilacina (80-120mg/kg ket. + 5-16mg/kg xil.) por vía intraperitoneal, la cual los deja inconscientes el tiempo suficiente para abrir su abdomen, extraer y microinyectar los testículos y volver a coser al animal (30-45 minutos).

Para evitar una posible hipotermia postoperatoria y facilitar la recuperación del animal, los ratones eran ubicados bajo una lámpara de rayos infrarrojos.

##### **3.11.1.2 Preparación de las Células para su Trasplante**

Las células AB1<sub>tomato</sub> a trasplantar se despegaron de los frascos de cultivo mediante una solución de Tripsina-EDTA y se centrifugaron a 250 g en tubos de 15 ml. Se disgregó el precipitado obtenido en una cantidad de PBS suficiente para que la concentración final fuera de entre 1 y 1.5 x 10<sup>6</sup> de células por ml. La solución celular era teñida previamente con azul de bromofenol (0.5 mg/ml) para poder realizar un seguimiento

visual del correcto llenado de los túbulos seminíferos. El volumen necesario para llenar cada testículo está estimado entre 30 y 50  $\mu$ l.

### 3.11.1.3. Microinyección de los Conductillos Eferentes

La forma elegida para llevar a cabo el trasplante de las células al interior de los túbulos seminíferos fue a través de los conductillos eferentes que unen la rete testis con la cabeza del epidídimo. Dichos conductillos poseen una densa cubierta conjuntiva por lo que son duros de atravesar, pero una vez introducida la aguja es más fácil lograr un llenado más completo de los túbulos (Figura 17).

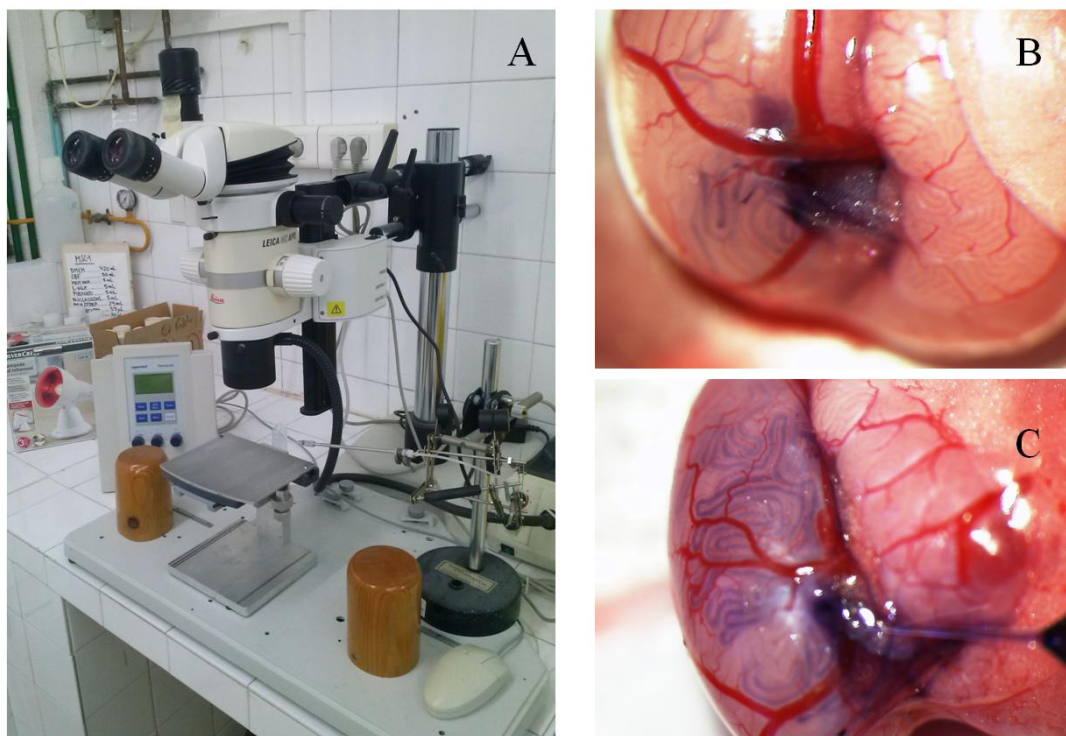


Fig. 17: **Trasplante al interior de los túbulos seminíferos.** (A) Para llevar a cabo el trasplante al interior de los túbulos seminíferos se empleó un equipo de micromanipulación *Singer* unido a un inyector *Eppendorf*. El microscopio estereoscópico empleado (*Leica Apomed*) tiene acoplado un sistema de iluminación incidente. (B-C) La vía de microinyección al interior de los túbulos seminíferos probada fueron los conductillos eferentes. Una vez la solución llega a la *rete testis*, comienza a repartirse por los demás túbulos, no lográndose un llenado completo de la red de los túbulos seminíferos.



### **3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DE IMAGEN**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa IBM SPSS Statistics 22. Se utilizó la distribución de t-Student para determinar si las muestras tratadas eran significativamente diferentes de las muestras control. Se consideró  $p < 0.05$  estadísticamente significativo.

Las imágenes de microscopía fueron analizadas y posteriormente editadas mediante el software ImageJ 1.48 y Microsoft Office Powerpoint 2007.

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EFECTO DE LAS CÉLULAS ES Y EC SOBRE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS (STO) Y SOBRE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE PTCs.

Durante los ensayos de aislamiento de PTCs mediante cultivos organotípicos, sorprendentemente las células que envolvían los pequeños fragmentos de los túbulos seminíferos para abandonaban el explante, cubriendo el fondo de la placa (Fig.18).

Ante esta observación, se planteó el análisis *in vitro* de la capacidad de migración de las células mioides peritubulares en un hipotético microambiente tumoral.

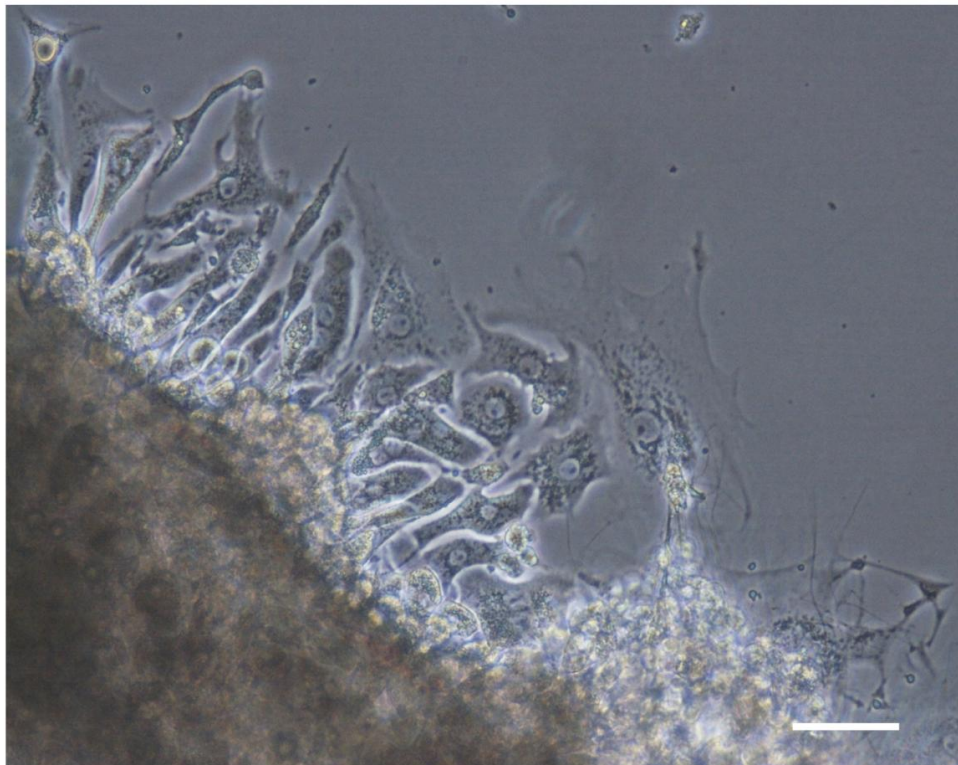


Fig. 18: Células PTCs alejándose del fragmento de tubo seminífero. Foto tomada a 24 horas después de realizar el explante. Barra de escala 75  $\mu$ m.

#### **4.1.1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN DE LOS CULTIVOS DE FIBROBLASTOS STO Y CULTIVOS PTCs.**

En primer lugar se llevaron a cabo los experimentos de *wound healing* con la línea establecida de fibroblastos embrionarios STO con la intención de poner a punto esta técnica para el posterior ensayo con los cultivos primarios de PTCs.

##### **4.1.1.1. Ensayos de migración con células STO en presencia de Células ES y EC.**

Alrededor de los insertos de silicona utilizados para los ensayos de migración se cultivaron las líneas celulares AB1, P19 y F9 y tras 24 horas se pudo observar una velocidad mayor en el avance de las células STO cuando éstas se encuentran en co-cultivo con las células ES y EC (Fig. 13). Además cabe destacar la forma de avance desorganizada respecto al control, dejando tras de sí espacios libres de células marcados con asteriscos (\*) en las fotografías D, F, H de la Fig. 19. En la figura 21A se muestran las diferencias significativas en el porcentaje de área cubierta por las células durante el experimento.

##### **4.2.1.2. Ensayos de Migración con Cultivos Primarios de PTCs tratados con Medios Condicionados por Células EC.**

Tras observar el efecto promigratorio de los medios condicionados tanto por las células ES como por las células ES, se decidió que los ensayos de *wound healing* con cultivos primarios de PTC se realizaran con medios condicionados de la línea celular F9 (Fig. 20). En la figura 22 se muestran las diferencias significativas en el porcentaje de área cubierta por las células durante el experimento.

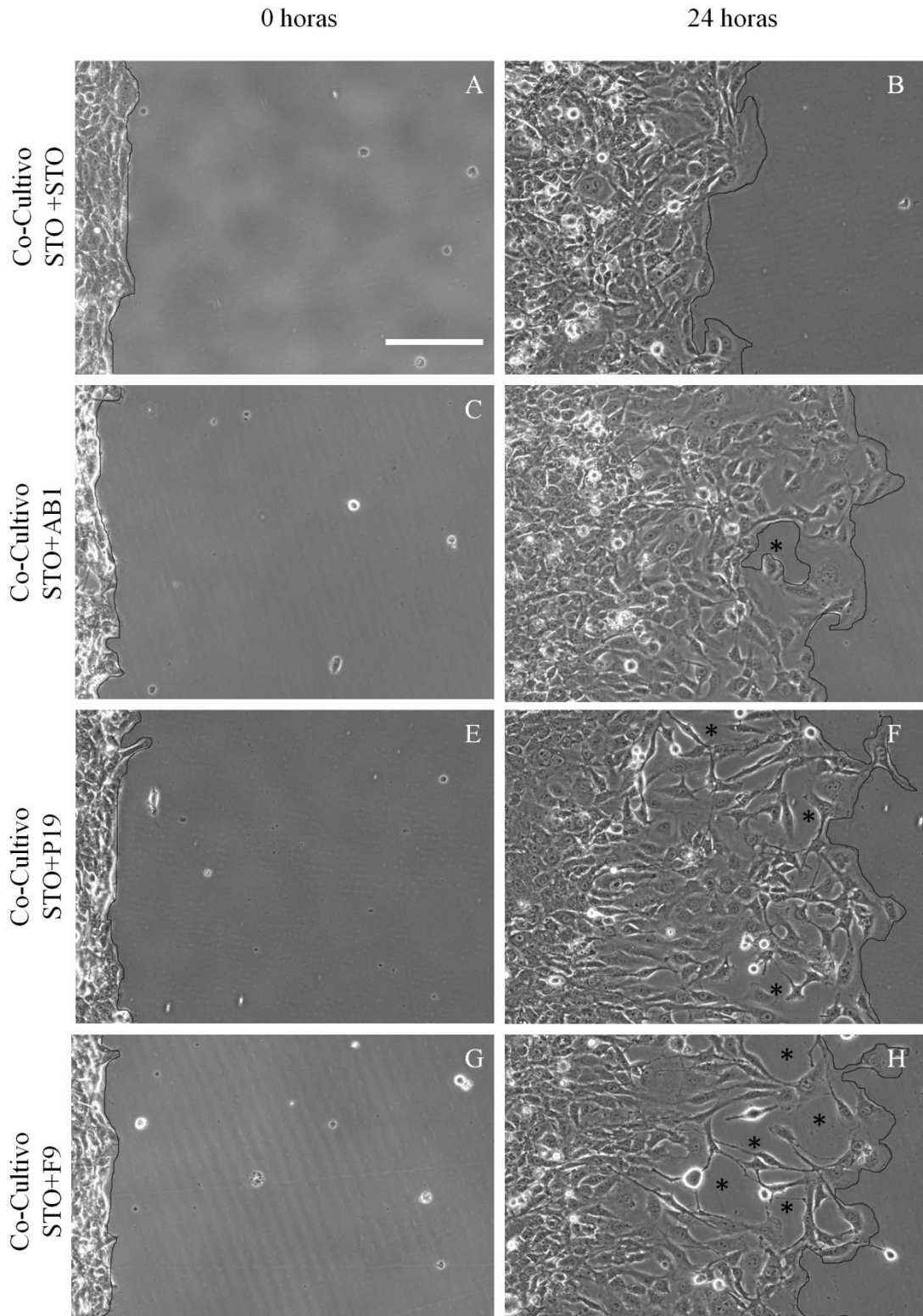


Fig. 19: **Efecto de las células ES y EC sobre la capacidad de migración de los fibroblastos STO.** Fotografías del ensayo con fibroblastos y el efecto que producen sobre ellas la presencia de células ES y EC. Los asteriscos representan las áreas libres de células. Barra de escala 250  $\mu$ m.

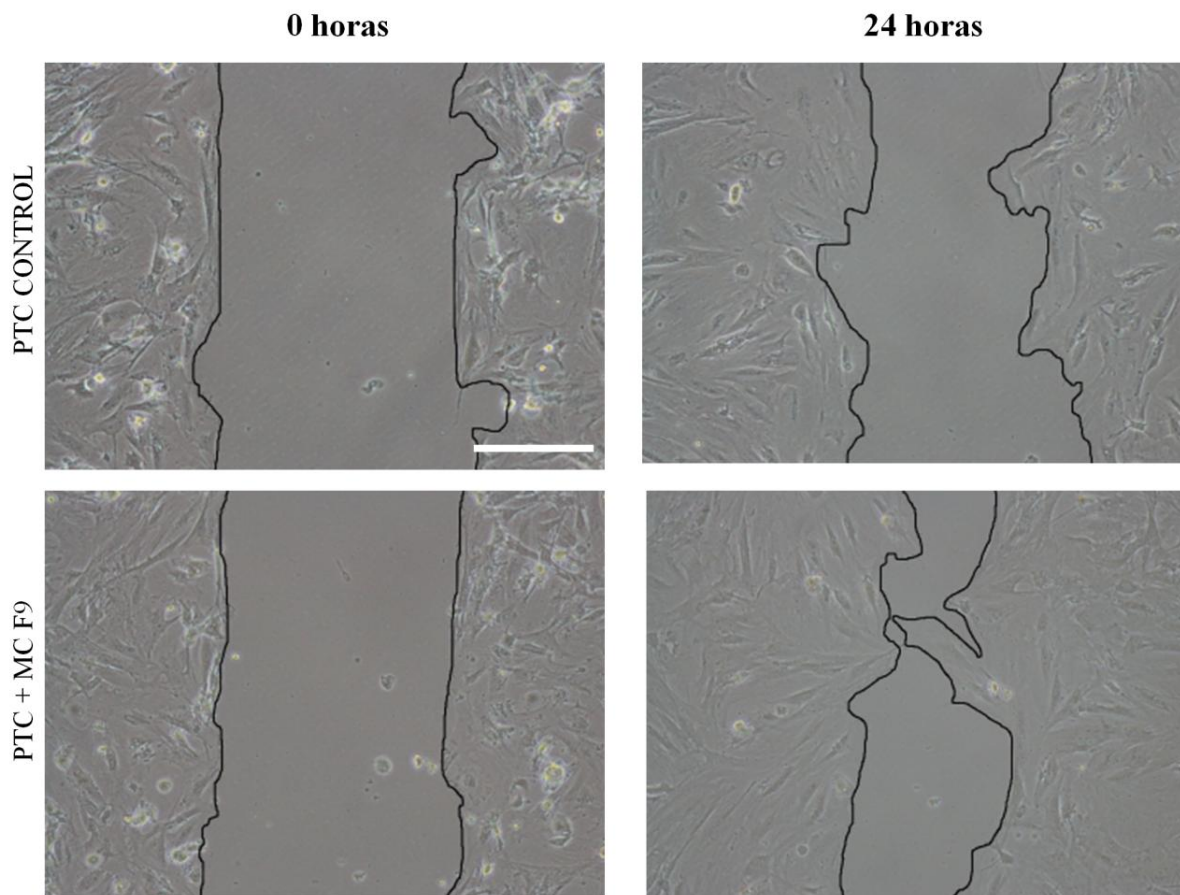


Fig. 20 : **Efecto del medio condicionado por las células F9 sobre la capacidad de migración de las PTCs.** Fotografías del ensayo con PTCs a 0 horas y 24 horas después de ser tratadas con el medio condicionado por las células F9. Barra de escala 250  $\mu$ m.

#### **4.1.2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LOS FIBROBLASTOS STO Y DEL CICLO CELULAR DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE PTCs TRATADOS CON MEDIOS CONDICIONADOS POR CÉLULAS EC.**

Un aumento en la capacidad de migración de las células puede ser debido a un aumento en la tasa de proliferación del cultivo. Por lo que para asegurarnos de que el mayor porcentaje de área cubierta en el mismo tiempo por los cultivos tratados con medios condicionados es debido a un aumento en la capacidad de migración, analizamos el ciclo celular de los cultivos PTC y la proliferación de los fibroblastos STO.

#### **4.2.2.1. Recuento celular.**

Se observó que no existía efecto alguno del medio condicionado sobre la tasa de proliferación de los fibroblastos STO (Fig. 21B) mediante recuento celular utilizando una cámara cuentaglóbulos tipo Bürker (Blaubrand) y tiñendo la suspensión previamente con Azul Tripán a una concentración del 0,4% para diferenciar las células vivas de las células muertas.

#### **4.2.2.2. Análisis del ciclo celular.**

Antes de que se produzca la mitosis (fase M), las células llevan a cabo las 3 fases correspondientes al ciclo celular: fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>. La fase G<sub>1</sub> es una fase donde las células prácticamente doblan su tamaño y sintetizan proteínas y RNA. En la fase S, las células replican su DNA y en la fase G<sub>2</sub> la célula continúa sintetizando proteínas y RNA como paso a previo a su división en dos células hijas (fase M).

Para analizar el ciclo celular de las PTCs se cultivaron células control y células tratadas con medio condicionado previamente por cultivos de células F9 durante 24 horas.

Al analizar los resultados obtenidos en el citómetro de flujo no se observaron diferencias significativas en las diferentes fases del ciclo celular entre los cultivos control y los cultivos tratados (Fig. 22).

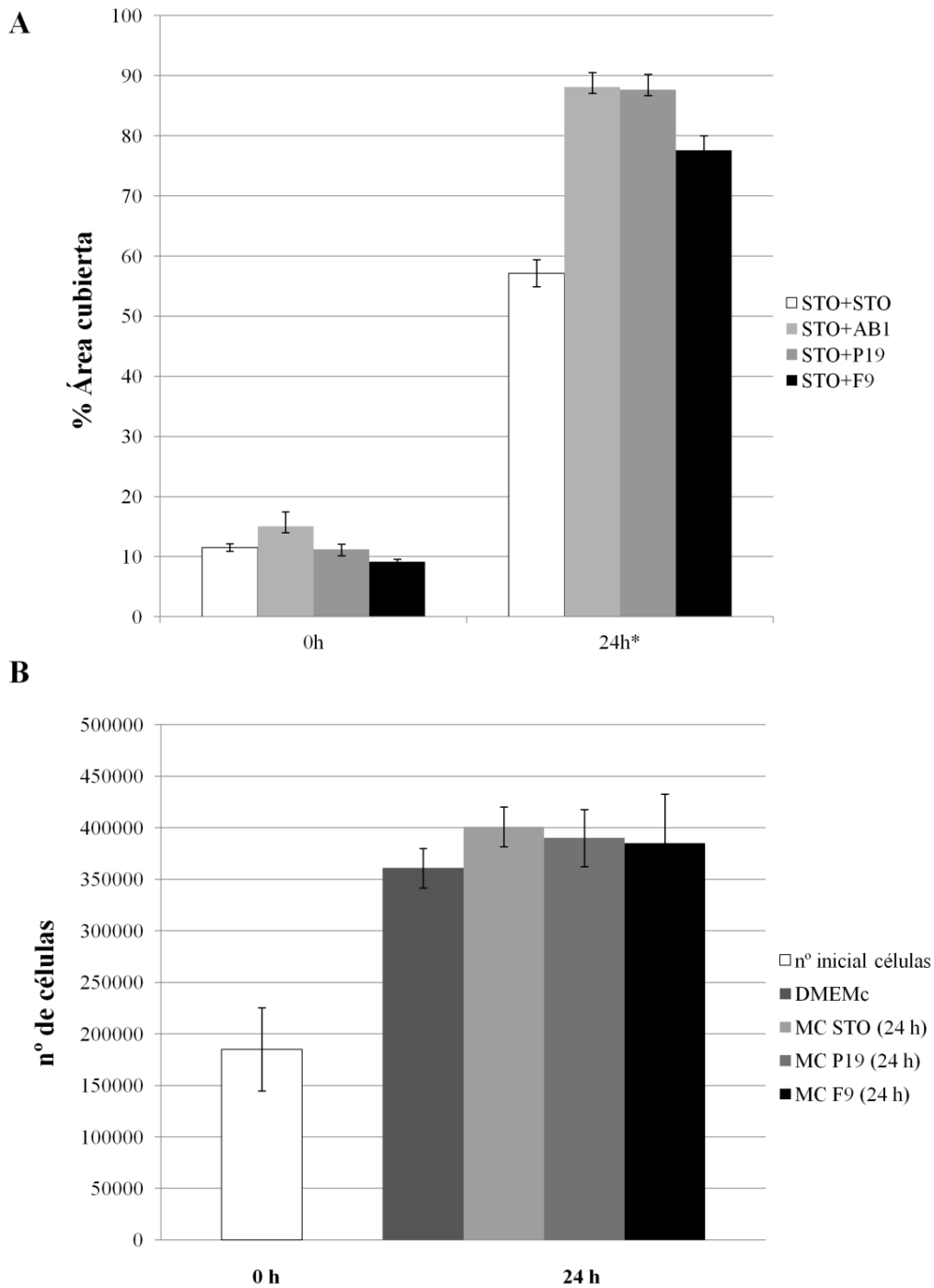


Fig. 21: **Representaciones gráficas de las respuestas de los fibroblastos STO en presencia de células ES y EC.** (A) Diferencias en el % de área cubierta por los cultivos STO 24 horas después de compartir cultivo con células ES y EC. (B) Aumento del número de células STO tras ser tratadas con medios condicionados por células EC.



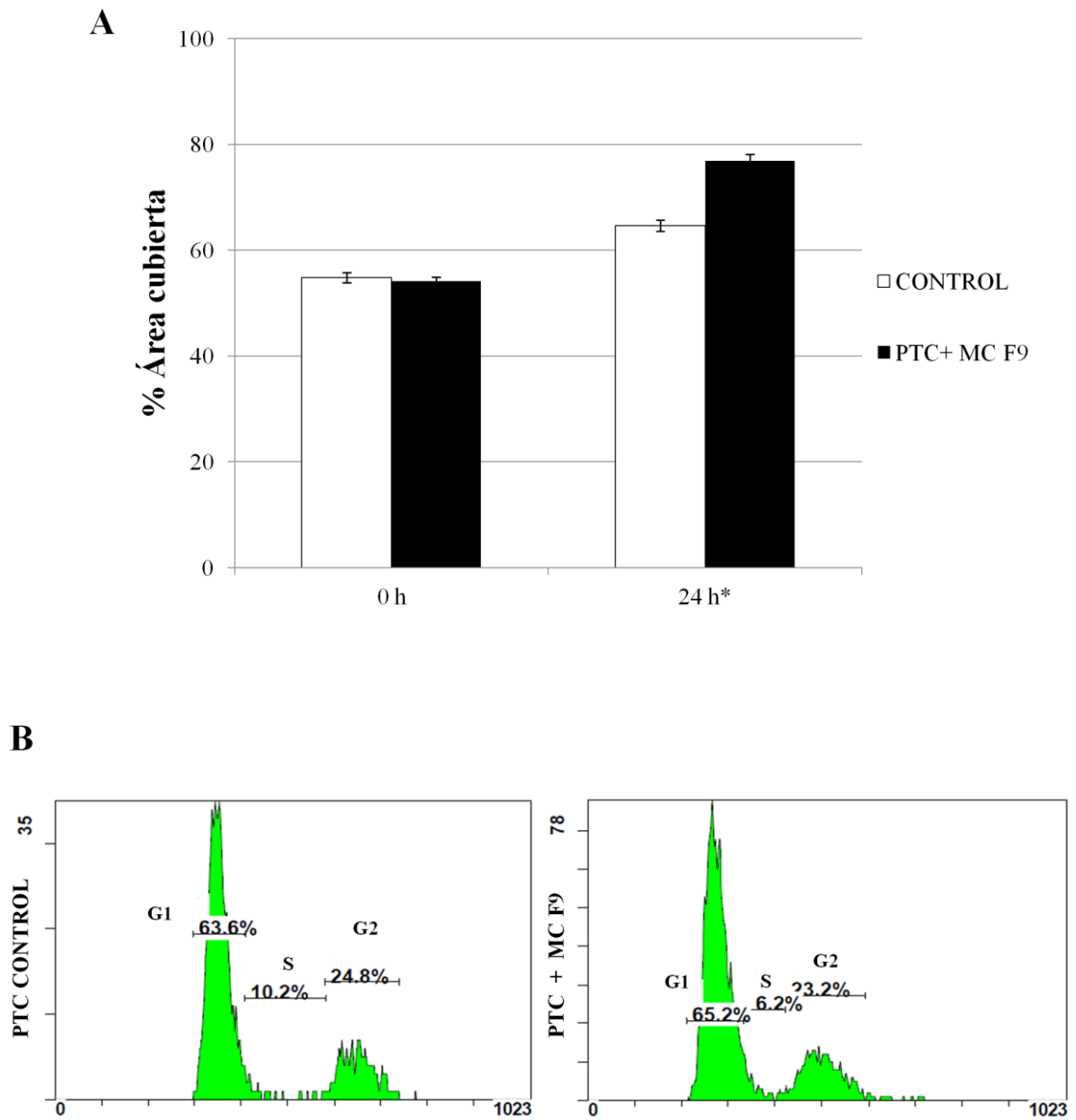


Fig. 22: Representaciones gráficas de las respuestas de los cultivos primarios de PTC tratados con medios condicionados por células F9. (A) Diferencias en el % de área cubierta entre PTC control y PTC tratados con medio condicionado de F9. (B) Los perfiles del ciclo celular correspondiente a cultivos de PTC control (derecha) y PTC tratados con medio condicionado por células F9 (derecha).

## **4.2. EFECTO DE LAS CÉLULAS EC SOBRE LA EXPRESIÓN DE MMPs Y TIMPs EN LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE PTCs.**

Para un análisis más extenso de los posibles cambios que sufren las células PTCs durante el desarrollo y progresión de un TGCTs se procedió al aislamiento de RNA de los cultivos primarios de PTC control y de los cultivos primarios de PTC tratados con medios condicionados por células EC (línea F9). El RNA obtenido se sometió a retrotranscripción para obtener el cDNA que se utilizó como molde para la reacción de PCR convencional.

### **4.2.1. EXPRESIÓN DE MMPs Y TIMPs MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR CONVENCIONAL.**

El análisis de PCR se empleó para detectar la expresión a nivel del mRNA de algunas de las MMPs más importantes en cuanto a los procesos de invasión (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-11, MMP-13, MMP-14) así como los inhibidores tisulares de MMPs TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4.

El patrón de expresión de las proteasas y sus inhibidores en ambas condiciones resultó ser similar. Las metaloproteasas MMP-3, MMP-9, MMP-11 y MMP-14, así como los inhibidores TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 resultaron ser positivos en los cultivos control y en los cultivos tratados. La presencia de RNAm para las metaloproteasas MMP-1, MMP-7 y el inhibidor TIMP-4 no fue detectada en ninguna de las dos condiciones. Y en el caso de las metaloproteasas MMP-8 y MMP-1, se detectan levemente la presencia de su RNAm cuando los cultivos son tratados con el medio condicionado por la línea de células EC.

Un resultado que llama la atención es la elevada expresión respecto a las otras metaloproteasas de la MMP-2 y la MMP-9. Y más concretamente, la elevada expresión de la metaloproteasa MMP-9 en los cultivos tratados con medios condicionados. Este último resultado indicaría que en el medio condicionado por la línea celular F9 existe una serie de factores que inducen un aumento en la expresión de esta metaloproteasa por parte de los cultivos primarios de PTC (Fig.23).

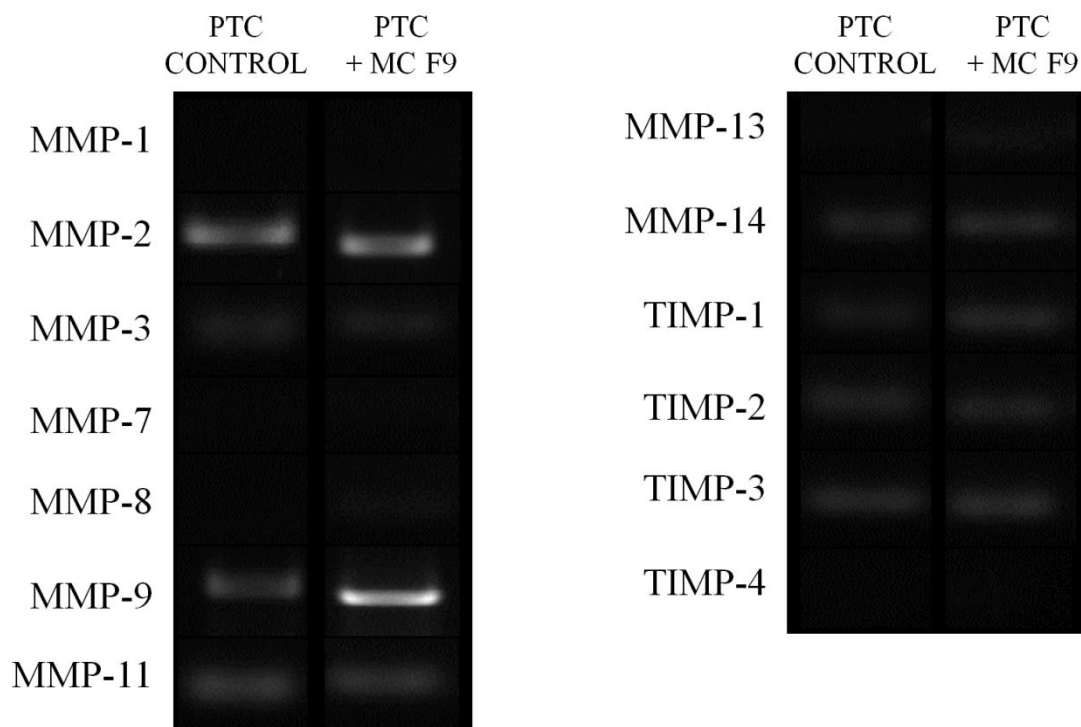


Fig. 23: **Análisis de la expresión de MMPs y TIMPs.** Los cultivos primarios de PTC control y cultivos primarios de PTC fueron tratados 24 horas con medio condicionado por células F9.

#### 4.2.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GELATINASAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVA.

Tras comprobar que las muestras procedentes de los cultivos de PTCs presentaban una mayor expresión en las dos gelatinas (MMP-2 y MMP-9) respecto a las demás metaloproteasas, y dado que la sobre-expresión de estas metaloproteasas suelen aparecer en distintos carcinomas y se relaciona con un fenotipo invasivo, se procedió al análisis cuantitativo de la expresión de estos dos enzimas, prestando especial atención a la MMP-9, para determinar el posible papel de las PTCs en el proceso de invasión de los TGCTs.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR cuantitativa mostraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de la gelatinasa MMP-9 por parte de los cultivos primarios de PTCs cuando estos son tratados con medio condicionado de células EC. Mientras que la expresión de la MMP-2 se mantuvo más constante (Fig. 24).

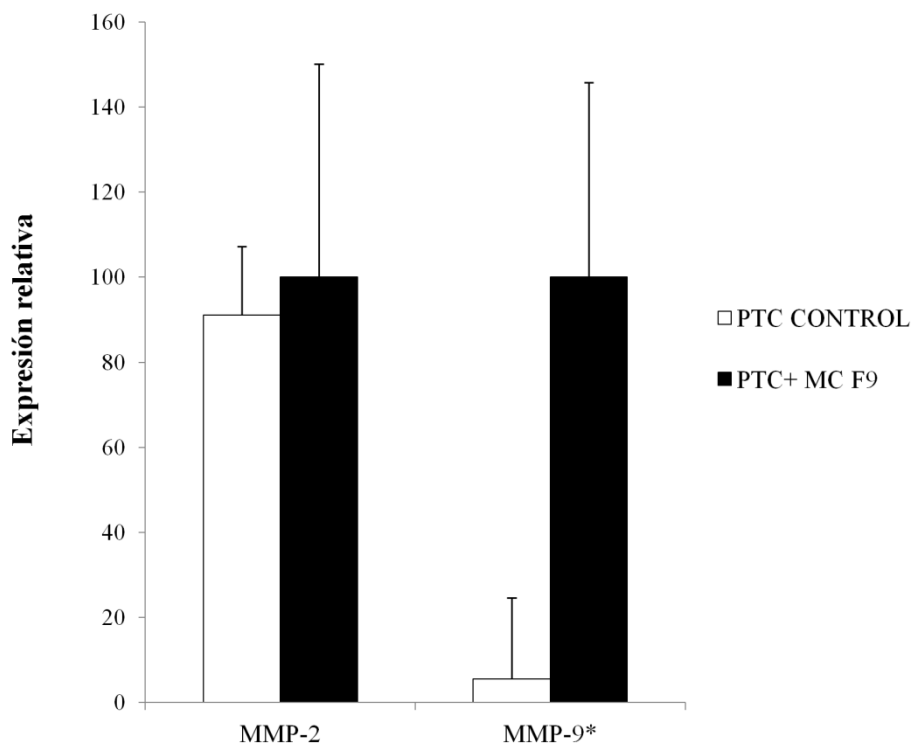


Fig. 24: **Representación gráfica de la expresión relativa de las gelatinasas MMP-2 (izquierda) y MMP-9 (derecha) a nivel de RNAm** en los cultivos de PTC control y cultivos PTC tratados con medio condicionado de F9.

La diferencia en los niveles de MMP-2 entre las dos condiciones no es estadísticamente significativa. Aunque en los diferentes experimentos realizados se encontró una variabilidad mayor en la expresión de esta gelatinasa respecto al elevado nivel de expresión de la MMP-9.

#### **4.2.3. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE MMPs EN MEDIOS CONDICIONADOS POR CULTIVOS DE PTCs**

La mayoría de las metaloproteasas de matriz son secretadas al medio en forma de proenzimas inactivas, y una vez allí pueden ser activadas mediante la proteólisis de su predominio, generalmente por otras MMPs o por la forma activa de las misma proteasas. La acumulación de estas MMPs en el medio permite que sean identificadas fácilmente mediante una electroforesis de las proteínas presentes en el medio de cultivo a través de un gel que contenga el sustrato específico de las MMPs que queremos detectar. En nuestro caso, las electroforesis de los medios de cultivo se realizaron en

geles de poliacrilamida con gelatina para detectar la actividad de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9.

#### **4.2.3.1. Zimografía de geles de gelatina.**

Las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) son unas de las metaloproteasas que se expresan en una mayor variedad de tejidos y de forma abundante. Para la detección de su actividad se han empleado geles de poliacrilamida con gelatina al 0.1 % en los que se han realizado electroforesis de los medios de cultivo condicionados mediante la incubación de las líneas ES (AB1), EC (P19 y F9) y cultivos primarios de PTC (Fig.25). Y sus respectivos co-cultivos, prestando especial atención a la interacción entre PTCs y la línea celular F9 (Fig. 25).

Cada gelatinasa puede identificarse por su peso molecular. Y todas las líneas celulares analizadas expresan la MMP-2 (72 kDa). Si bien su expresión es apenas detectable en el medio condicionado de la línea de carcinoma embrionario F9. En cuanto a la actividad de la MMP-9 sólo se detectó de manera importante en co-cultivo cuando las líneas celulares de carcinoma embrionario de ratón F9 y P19 cuando se encontraban en contacto directo con los cultivos de PTCs, detectándose un considerable aumento en la actividad de la forma de enzima (92 kDa). En menor medida, esta forma activa de la MMP-9 también fue detectada en los cultivos primarios de PTCs tratados con medios condicionados por células EC.

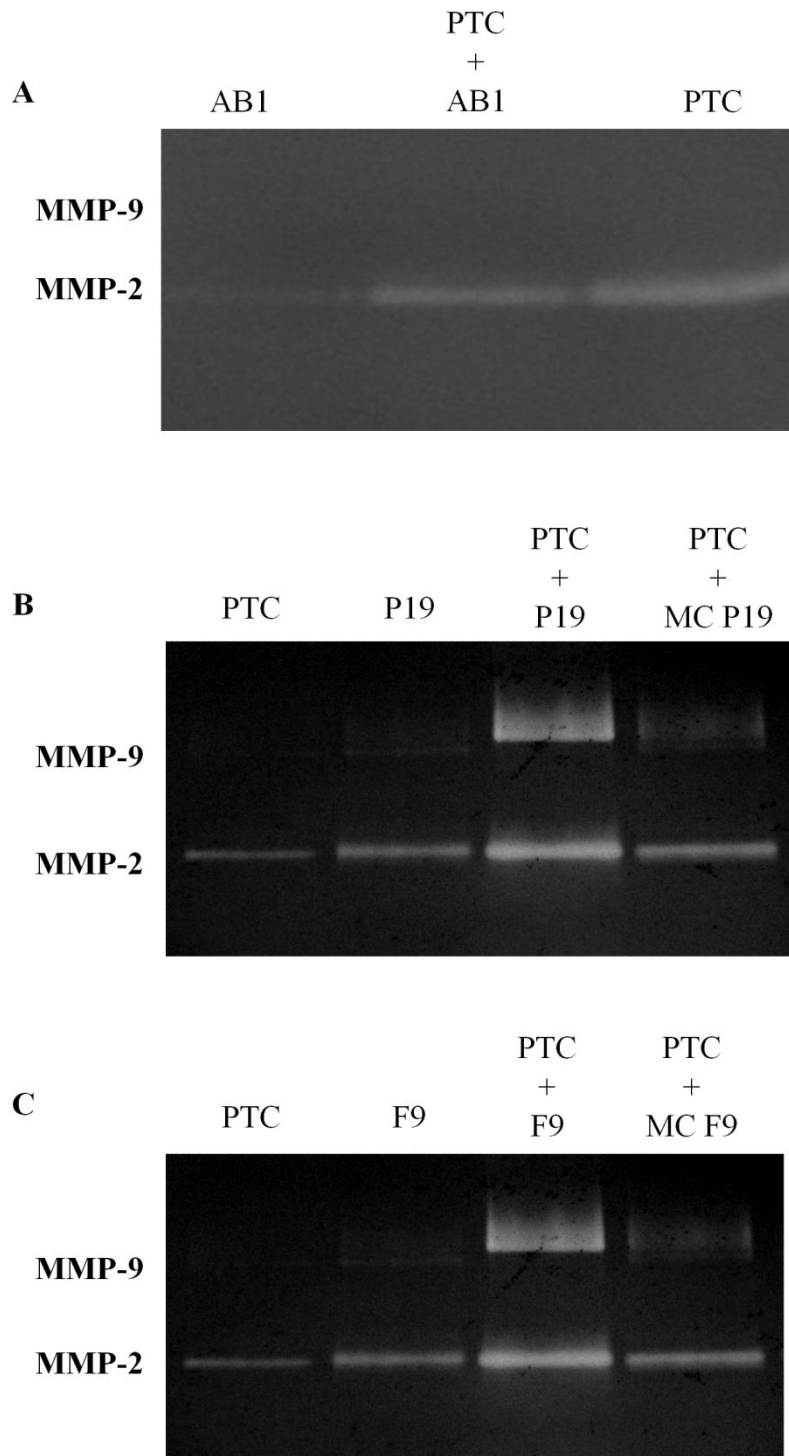


Fig. 25: **Zimografías de medios condicionados en geles de poliacrilamida con gelatina al 0.1%.** (A) Medios condicionados de células AB1, co-cultivo de PTC con AB1 y cultivo de PTCs. (B) Medios condicionados de cultivos de PTCs, células P19, co-cultivo de PTC con P19 y cultivo de PTC tratado con medio condicionado por P19. (C) Medios condicionados de cultivos de PTCs, células F9, co-cultivo de PTC con F9 y cultivo de PTC tratado con medio condicionado por F9.

#### 4.2.4. INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA GELATINASA MMP-9 EN LOS CULTIVOS DE PTCs.

Para confirmar la implicación de las PTCs en la secreción al medio de la gelatinasa MMP-9, se llevó a cabo una inmunocitoquímica sobre co-cultivos de células PTCs con células EC (línea F9) y cultivos de PTCs tratados con medios condicionados por células F9.

Se realizó un doble marcaje con un anticuerpo contra  $\alpha$ -SMA para identificar a las células PTC presentes en los cultivos primarios y con otro anticuerpo, se reconoció la gelatinasa MMP-9 (Fig.26).

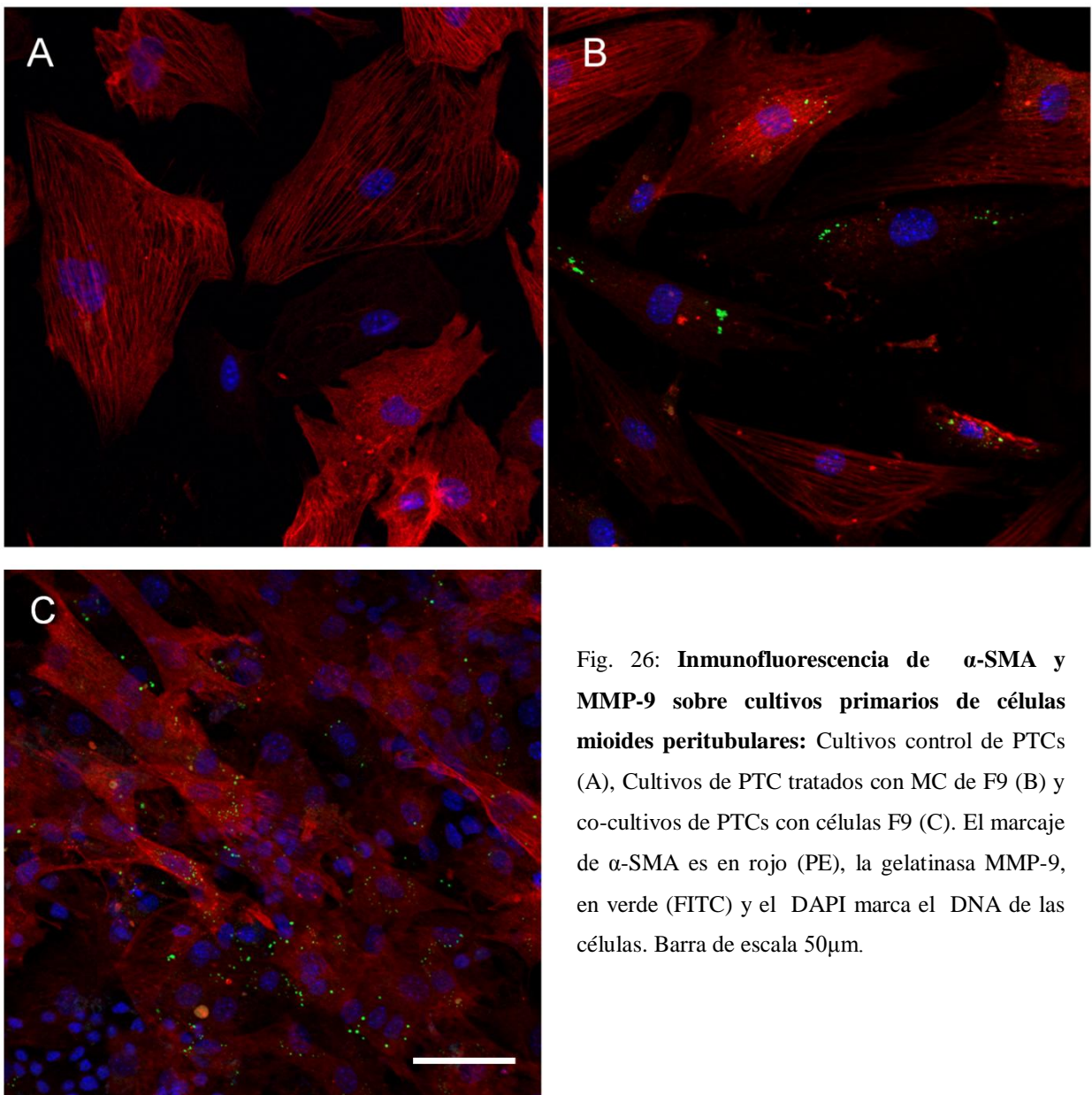


Fig. 26: **Inmunofluorescencia de  $\alpha$ -SMA y MMP-9 sobre cultivos primarios de células mioides peritubulares:** Cultivos control de PTCs (A), Cultivos de PTC tratados con MC de F9 (B) y co-cultivos de PTCs con células F9 (C). El marcaje de  $\alpha$ -SMA es en rojo (PE), la gelatinasa MMP-9, en verde (FITC) y el DAPI marca el DNA de las células. Barra de escala 50 $\mu$ m.

La MMP-9 apenas se encontró en los cultivos control (Fig.26A). En cambio, en los cultivos de PTCs tratados con el medio condicionado por la línea F9 la presencia de la gelatinasa MMP-9 era más frecuente (Fig. 26B). Finalmente, se puede observar en la inmunofluorescencia de los co-cultivos de ambos tipos celulares que la presencia de MMP-9 es evidente, confirmándose así la estimulación de la expresión de MMP-9 en las PTCs por parte de las células F9.

A la espera de futuros análisis más detallados, este resultado induce a pensar que las células PTCs son uno de los principales tipos celulares responsables del aumento en la concentración de la gelatinasa MMP-9 en el microambiente tumoral del testículo.

### **4.3. EFECTO DE LA MOLÉCULA TNF- $\alpha$ LOS CULTIVOS DE PTCs.**

La citoquina *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) es una molécula que presenta una dualidad funcional en el microambiente tumoral debido a su implicación el desarrollo y progresión de tumores así como por su capacidad supresora de los mismos (Wajant *et al.*, 2003).

El efecto de esta molécula sobre la actividad secretora de las PTC y su implicación en procesos de espermatogénesis ha sido previamente estudiada (Schell *et al.*, 2008). Para profundizar en la posible respuesta de las células mioides peritubulares al aumento del TNF- $\alpha$  derivado por la presencia de un TGCT, se estudiaron los efectos de esta molécula sobre las PTCs, analizando la capacidad de migración y secreción de MMP-2 y MMP-9.

#### **4.3.1. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CON CULTIVOS DE PTCs TRATADOS CON TNF- $\alpha$ .**

Se llevaron a cabo ensayos de migración con cultivos primarios de PTC control y cultivos tratados con TNF- $\alpha$  (5ng/ml y 25ng/ml). En la figura 27 se muestra que no existen diferencias significativas en el porcentaje de área cubierta por las células control y las células tratadas con esta molécula durante el experimento de *wound healing*.



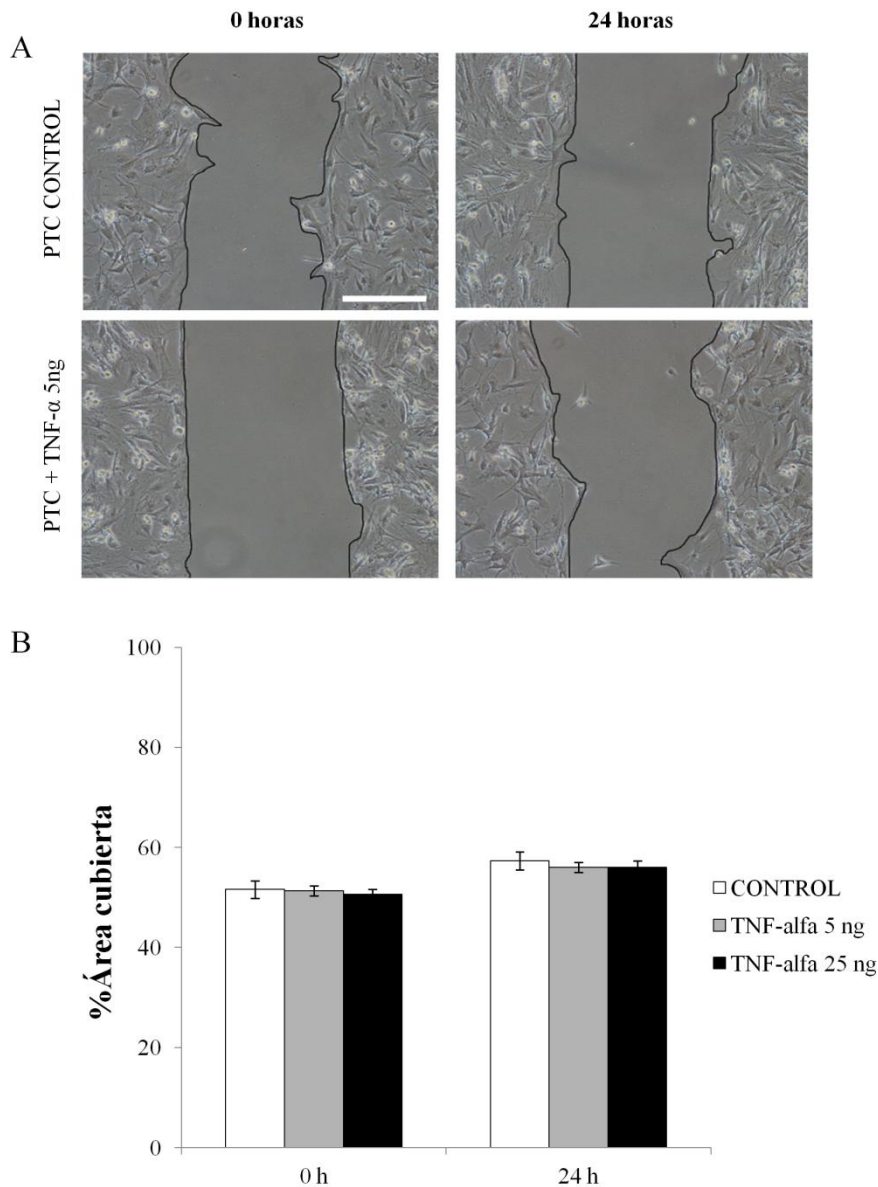


Fig. 27: **Efecto de la molécula TNF- $\alpha$  sobre la capacidad de migración de las PTCs.** (A) Fotografías del ensayo con PTCs a 0 horas y 24 horas después de ser tratadas TNF- $\alpha$  (5 ng/ml). Barra de escala 250  $\mu$ m. (B) Representación gráfica de las diferencias en % de área cubierta entre PTC control y PTC tratados con TNF- $\alpha$  (5 ng/ml y 25 ng/ml).

A pesar de ser descrita como una molécula promigratoria (Xinaris *et al.*, 2013) este resultado induce a pensar que en los medios condicionados por la línea celular F9 existe otra molécula responsable del aumento en la capacidad de migración de los cultivos primarios de células mioides peritubulares.

### 4.3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE GELATINASAS MEDIANTE EN CULTIVOS DE PTCs TRATADOS CON TNF- $\alpha$ .

Se encuentra descrito que la molécula TNF- $\alpha$  induce la secreción de MMP-9 en fibroblastos asociados al tumor (Stuelten *et al.*, 2005). Se quiso determinar si la molécula TNF- $\alpha$  posee este mismo efecto en los cultivos primarios de PTCs en su hipotético papel de fibroblastos asociados a un TGCT.

#### 4.3.2.1. Estudio de la Expresión de Gelatinasas mediante PCR Cuantitativa.

Tras obtener como resultado una diferencia significativa en la expresión de la gelatinasa MMP-9 por parte de los cultivos primarios de PTC tratados con medio condicionado por células F9, se comprobó por PCR cuantitativa la expresión de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 en los cultivos de PTC tratados con TNF- $\alpha$ .

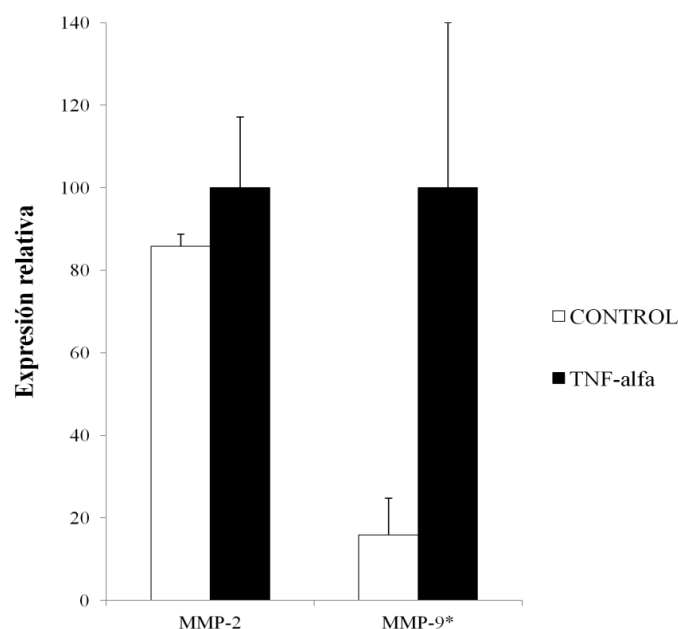


Fig. 28: Representación gráfica de la expresión relativa de las gelatinasas MMP-2 (izquierda) y MMP-9 (derecha) a nivel de RNAm en los cultivos de PTC control y cultivos PTC tratados con TNF- $\alpha$  (25ng/ml).

Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en cuanto a la expresión de la gelatinasa MMP-9 por parte de los cultivos primarios de PTCs cuando estos son tratados con la molécula TNF- $\alpha$ . Mientras que ese mismo aumento en la expresión de la MMP-2 no se produjo (Fig. 28).

#### 4.3.2.2. Estudio de la Secreción de Gelatinasas mediante Zimografía.

Se llevaron a cabo ensayos de zimografía en geles de poliacrilamida con gelatina al 0.1%. En estos geles se realizó una electroforesis de los medios condicionados por cultivos primarios de PTC tratados a con distintas concentraciones de TNF- $\alpha$  (Fig. 29)

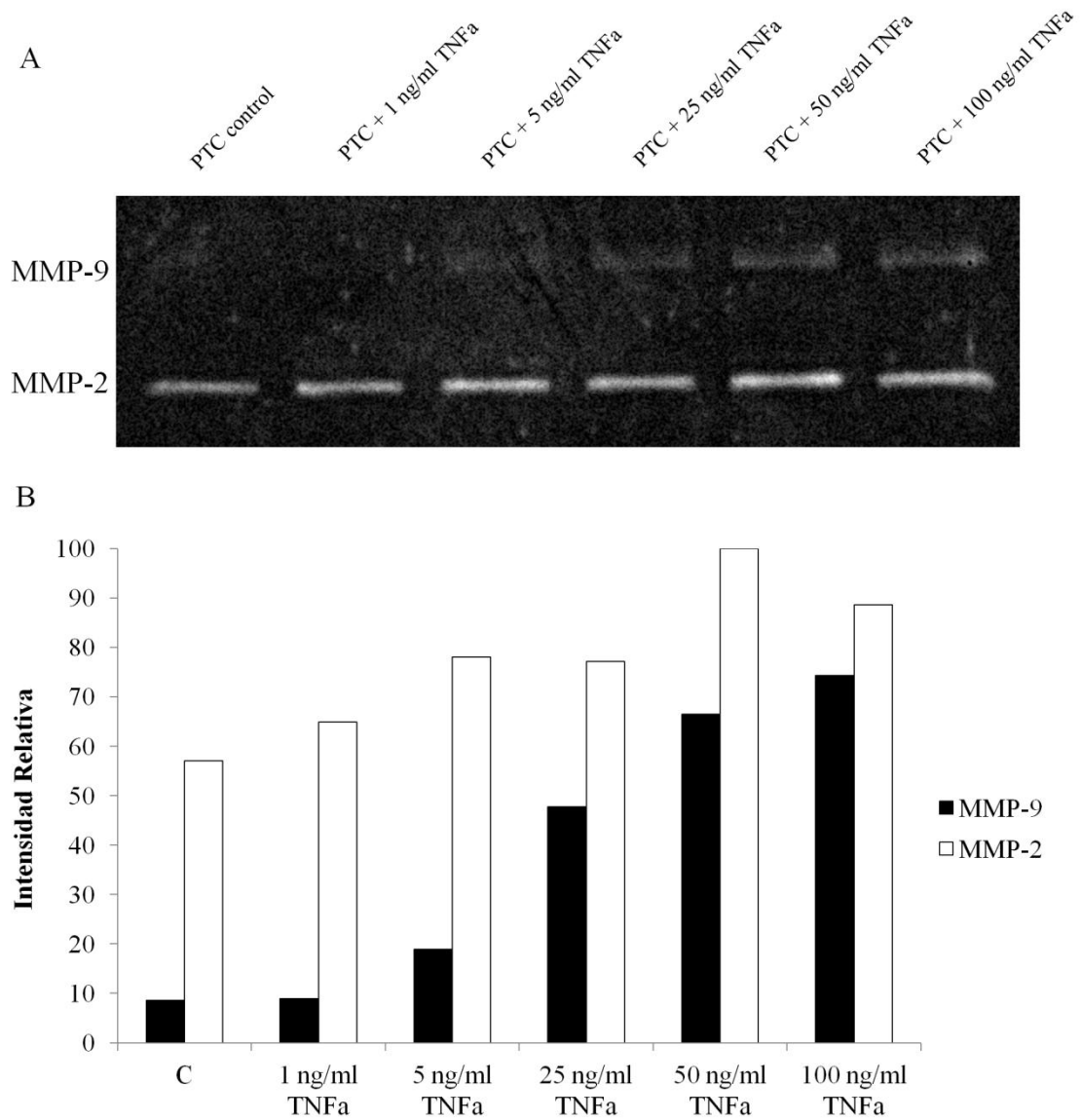


Fig. 29: **Zimografía de medios condicionados por células PTC tratadas con TNF- $\alpha$ .** (A) Gel de poliacrilamida con gelatina al 0.1% y los de cultivos de PTCs, células tratados con una concentración creciente de TNF- $\alpha$ . (B) Representación gráfica de la cuantificación realizada por densitometría de la digestión realizada por MMP-9 y MMP-2 en el gel (A) de zimografía.

Se pudo identificar la relación creciente entre la concentración de TNF- $\alpha$  del medio y la cantidad de MMP-9 secretada por los cultivos primarios de PTC. A partir de los 5 ng/ml se puede apreciar la banda correspondiente al peso molecular de la MMP-9 (92 kDa), siendo más evidente a la concentración de TNF- $\alpha$  máxima aplicada de 100 ng/ml. En cuanto a la secreción de la MMP-2 (72 kDa), también se puede apreciar como su secreción aumenta con la concentración de TNF- $\alpha$  en el medio, aunque en este caso la presencia de MMP-2 ya es elevada en el cultivo control.

#### 4.4.2.3. Inmunolocalización de la Gelatinasa MMP-9 en los Cultivos de PTCs tratados con TNF- $\alpha$

Tal y como se realizó en la inmunocitoquímica sobre co-cultivos de células PTCs con células EC (línea F9) y cultivos de PTCs tratados con medios condicionados por células F9, se realizó también un doble marcaje de  $\alpha$ -SMA y de la gelatinasa MMP-9 en cultivos tratados con TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) para confirmar la implicación de las PTCs en la secreción de MMP-9.

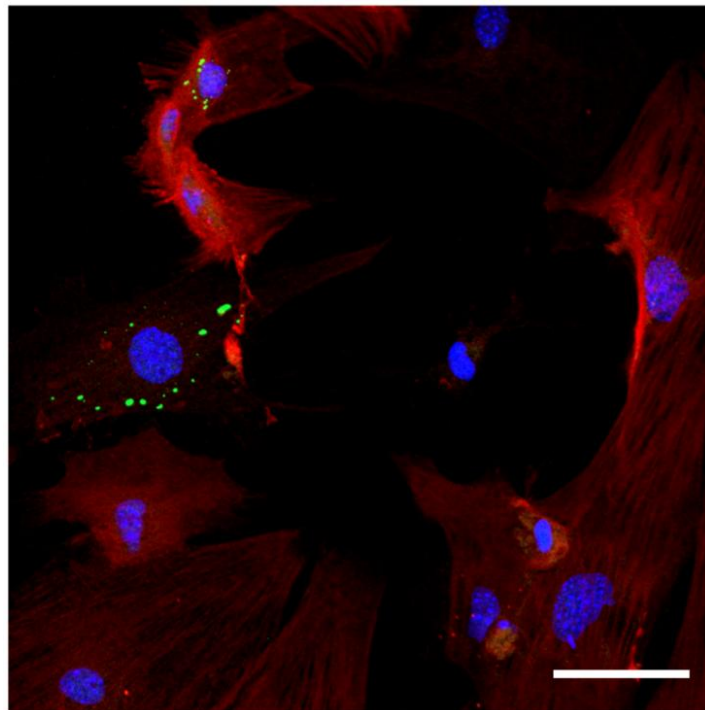


Fig. 30: Inmunofluorescencia de  $\alpha$ -SMA y MMP-9 sobre cultivos de PTC tratados con TNF- $\alpha$ . El marcaje de  $\alpha$ -SMA es en rojo (PE), la gelatinasa MMP-9, en verde (FITC) y el DAPI marca el DNA de las células. Barra de escala 50 $\mu$ m.

Se pudo observar una mayor presencia de MMP-9 en los cultivos tratados con TNF- $\alpha$  (Fig. 30) respecto a los cultivos control (Fig. 26 A), por lo que se podría decir que la molécula TNF- $\alpha$  estimula la expresión de MMP-9 en los cultivos primarios de PTCs.

#### 4.3.3. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE TNF- $\alpha$ EN LOS MEDIOS DE CULTIVO CONDICIONADOS POR PTCs, CÉLULAS EC Y CO-CULTIVOS.

Se llevó a cabo el inmunoensayo ELISA (Fig. 31) para detectar la presencia de TNF- $\alpha$  en los medios procedentes de cultivos primarios de PTCs, PTCs tratados con medio condicionado por células F9, cultivos de células F9, células F9 tratadas con medio condicionado por células PTC y co-cultivos para estudiar una posible relación directa entre la secreción de MMP-9 y la presencia de TNF- $\alpha$  en dichos medios.

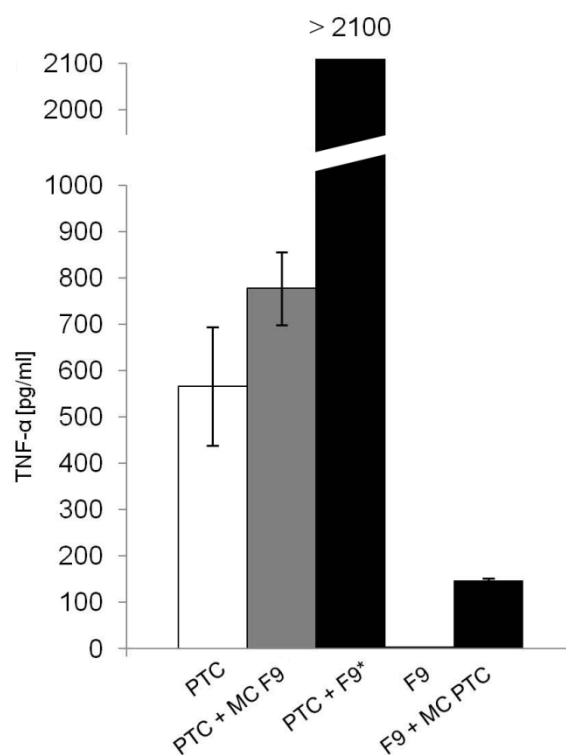


Fig. 31: Gráfica que representa las concentraciones de TNF- $\alpha$  obtenidas en el ELISA procedente de los medios condicionados objeto del estudio.

Los resultados obtenidos demuestran que en los cultivos primarios de PTCs existe una concentración basal de TNF- $\alpha$  cuya fuente de secreción se ve estimulada cuando el medio condicionado de las células F9 está presente. Por otro lado, el resultado que

sorprendió fue una cantidad apenas apreciable en los medios de las células F9 control, por lo que se podría asegurar que el TNF- $\alpha$  presente en los medios condicionados de F9 no es el responsable del estímulo observado en la migración y/o expresión de MMP-9 por parte de las PTCs.

Así mismo también se observa que la concentración de TNF- $\alpha$  en los cultivos de las células de F9 tratadas con medio condicionado de PTC es menor que la concentración presente en los medios condicionados de PTC (PTC control). La concentración esperada sería una similar a la encontrada en los cultivos de PTC control, esta disminución puede deberse a una posible degradación de la molécula TNF- $\alpha$  a lo largo del tiempo.

En el caso del medio condicionado procedente del co-cultivo entre ambas líneas, no se pudo calcular la concentración exacta ya que el dato superaba el valor máximo de la recta patrón del experimento. Este resultado resalta la importancia de la molécula TNF- $\alpha$  durante el las primeras fases del desarrollo del tumor testicular debido a las elevadas concentraciones existentes en un co-cultivo de contacto directo entre células EC y cultivos primarios de PTCs, lo cual demuestra que el TNF- $\alpha$  tendría un papel relevante en la estimulación de la expresión de MMP-9 en los cultivos primarios de PTCs.

Estos resultados obtenidos mediante el ELISA de medios condicionados no aclaran la fuente de secreción de TNF- $\alpha$  en los co-cultivos entre células F9 y los cultivos primarios de PTCs. Para determinar si son las células EC, las células PTCs o ambos tipos celulares, se llevaron a cabo nuevos ensayos.

#### **4.3.4. INMUNOLocalización de la molécula TNF- $\alpha$ los co-cultivos de PTCs con células EC.**

Tras los resultados obtenidos en el ELISA de medios condicionados, se determinó si la fuente de secreción del TNF- $\alpha$  cuando los cultivos de PTCs y células de la línea F9 se encontraban en co-cultivo de contacto directo era exclusiva de los cultivos primarios, las células EC o participaban ambos tipos celulares. Para ello se realizó un doble marcaje con un anticuerpo contra  $\alpha$ -SMA para identificar a las células PTC presentes en los cultivos primarios y con otro anticuerpo, se reconoció el TNF- $\alpha$  (Fig. 32).

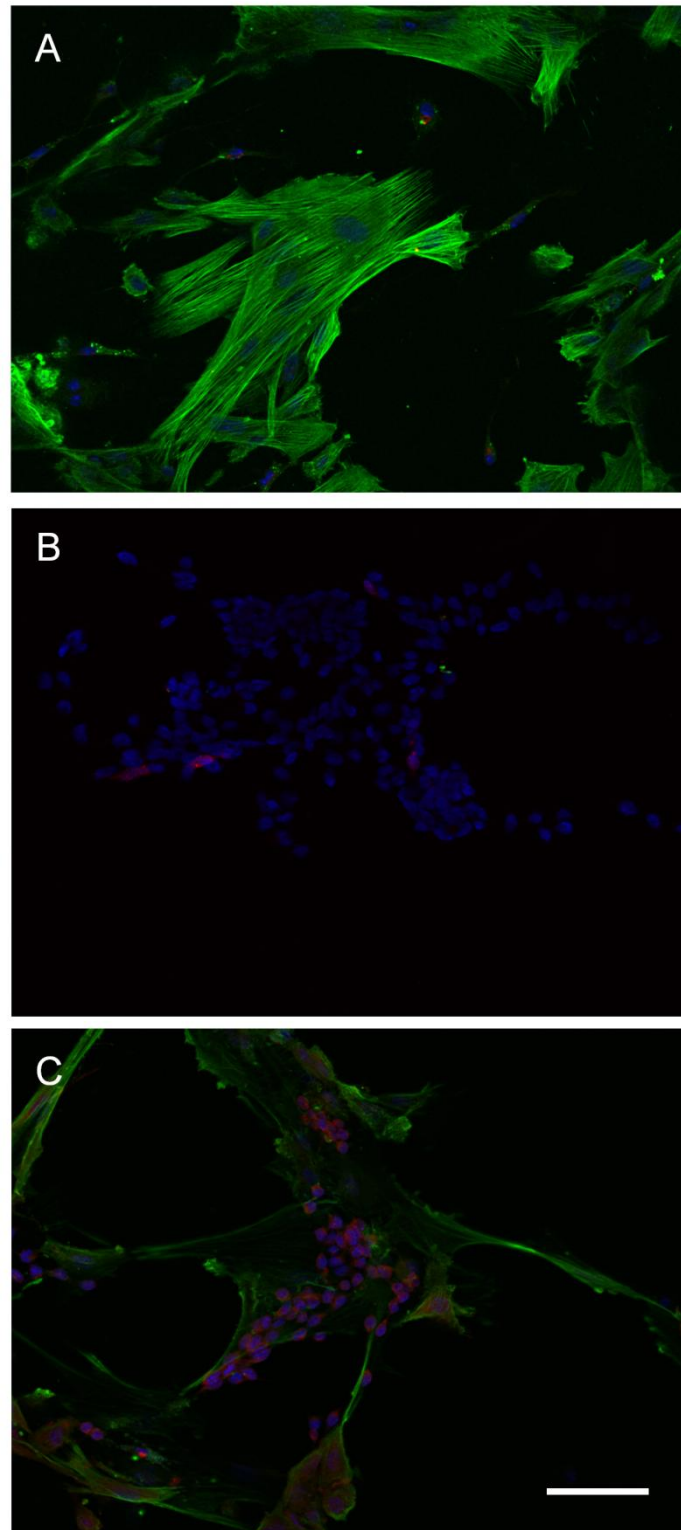


Fig. 32: **Inmunofluorescencia de  $\alpha$ -SMA y MMP-9 sobre cultivos primarios de células mioides peritubulares y células F9:** (A) Cultivos primarios de PTCs. (B) Cultivos de F9. (C) Co-cultivos de PTCs con células F9. El marcaje de  $\alpha$ -SMA es en verde (FITC), el TNF- $\alpha$  en rojo (Alexa Fluor 555) y el DAPI marca el DNA de las células. Barra de escala 50 $\mu$ m.

La detección mediante inmunocitoquímica de fluorescencia de la molécula TNF- $\alpha$  reveló que en tanto los cultivos primarios de células PTCs como los monocultivos de células F9 presentan una baja o ninguna positividad para TNF- $\alpha$  (Fig. 32 A y B). En los cultivos primarios pudo observarse una población de tipo fibroblasto que no presentaba positividad para  $\alpha$ -SMA pero sí para TNF- $\alpha$  (Fig. 32 A). Este resultado indicaría que otro tipo celular distinto a las PTCs presentes en el cultivo primario sería el responsable de la concentración de TNF- $\alpha$  presente en los medios control de PTCs utilizados.

En la figura 32 C, se pudo observar que cuando ambos tipos celulares se encuentran en co-cultivo y se produce un contacto directo, son las colonias de células F9 los principales responsables de la secreción de TNF- $\alpha$  aunque también se encuentra inmunopositividad en algunas de las PTCs observadas para TNF- $\alpha$  (Fig. 32 C abajo). Por lo que ambos tipos celulares son responsables de la elevada concentración de TNF- $\alpha$  detectada en los medios procedentes de los co-cultivos.

Ambos resultados se corresponden con los datos obtenidos en el experimento de ELISA (Fig. 31).

#### **4.4. APROXIMACIÓN A LAS FASES INICIALES DE INVASION TUMORAL EN EL CARCINOMA EMBRIONARIO DE TESTÍCULO.**

La aproximación in vivo a los cambios del estroma testicular durante las primeras etapas del proceso de invasión en la progresión y desarrollo de un TGCTs, se realizó microinyectando las células madre embrionarias AB1<sup>tomato</sup> en el interior de los túbulos del testículo de ratones P129. En este ensayo se prestó especial atención a la capa de células mioides peritubulares que rodean el túbulo seminífero

##### **4.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA DE CÉLULAS FLUORESCENTE AB1<sup>tomato</sup>**

Una vez llevada a cabo la **transfección** de las células AB1 con el plásmido ptd-Tomato-N1 con ayuda del kit Xfect mESC (Clontech, Cat. N° 631320) se seleccionaron en placas de 96 pocillos células fluorescentes mediante la técnica de dilución límite. Y a continuación se expandió esta nueva línea celular establecida como AB1<sup>tomato</sup>.



La **observación** de las colonias de AB1tomato al microscopio óptico convencional recuerda mucho a las células AB1 originales, formando colonias compactas con límites bien definidos. Al microscopio de fluorescencia comprobamos cómo estas colonias están formadas por células de pequeño tamaño. La mayor parte de las células que conforman la colonia presentan fluorescencia de intensidad variable entre ellas. La localización de la proteína no presenta ninguna acumulación en una región específica, apareciendo distribuida uniformemente por todo el interior celular (Fig. 27A).

Mediante **citometría de flujo** se comprobó que un 84.7% de las células de la línea celular aislada presentaban marcaje positivo, frente al 1.1% de la línea celular original (Fig. 27 B). Los ritmos de proliferación de las células AB1 sin transfectar y las AB1tomato se compararon mediante **citometría de flujo con yoduro de propidio**, donde un 54% de las células AB1 y un 75% de las células AB1tomato se encuentran en las fases de mayor potencial proliferativo (fases S+G2/M) (Fig. 27 C). También se pudo apreciar mediante **recuento celular** y la viabilidad con **MTT** que la línea AB1tomato resultó ser superior a la línea celular original (Fig. 33 D).

#### **4.4.2. HISTOLOGÍA DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES Y EL ESTROMA ASOCIADO**

Los testículos trasplantados fueron extraídos a los 10 días y analizados mediante histología en parafina (Fig. 34). Se obtuvieron 3 tipos de masas tumorales con un aspecto o grado de desarrollo diferente. La forma más sencilla que se observó fue la de una serie de **agregados celulares** (colonias AB1<sup>tomato</sup>) creciendo en la luz del túbulo seminífero (Fig. 34 A). En otras muestras se localizaron también intratubularmente teratocarcinomas donde el epitelio seminífero es sustituido totalmente, legándose a diferenciar un epitelio ciliado así como numerosas figuras mitóticas (Fig. 34 B). Y finalmente, fuera del túbulo también aparecieron formaciones con características de diferenciación tipo neural tales como el tubo neural o un epitelio ciliado en pequeños teratocarcinomas intersticiales (Fig. 34 C). Las células trasplantadas se encontraron en dos localizaciones distintas, pudiéndose diferenciar tres estadios de diferenciación distintos. En la zona próxima a las neoplasias intratubulares, no se llega a observar alteraciones evidentes en el estroma testicular, incluyendo a las células mioides peritubulares.

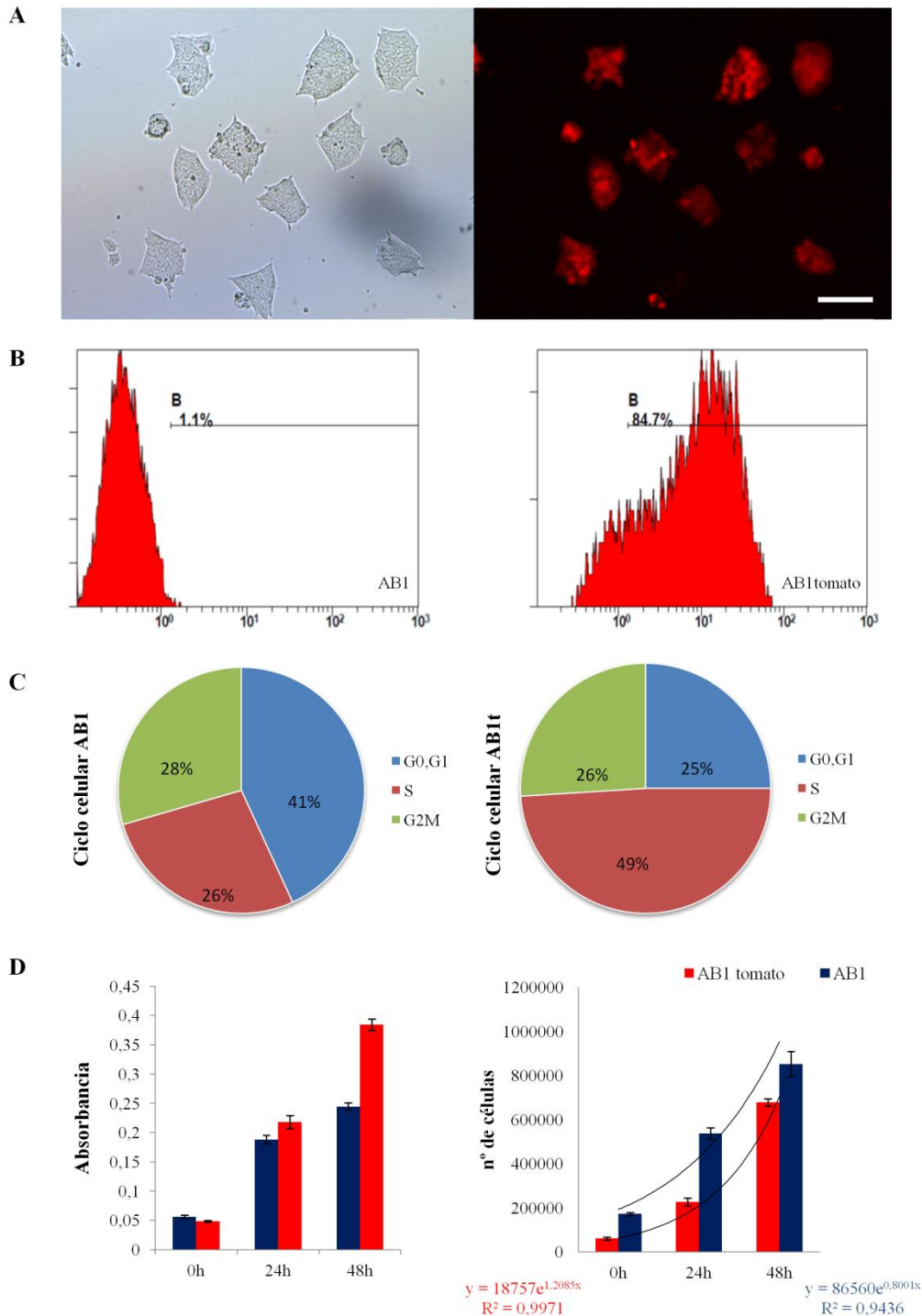


Fig. 33: **Caracterización de la línea celular AB1<sup>tomato</sup>**. (A) El aspecto de las células en cultivo es el típico de las células indiferenciadas, formando colonias celulares redondeadas. Puede apreciarse que la fluorescencia dentro de la colonia es heterogénea. Barra de escala 100  $\mu$ m. (B) La línea celular AB1<sup>tomato</sup> muestra fluorescencia en aproximadamente el 84.7% de las células que la componen. (C) Los datos de ciclo celular obtenidos muestran un potencial proliferativo de las células AB1<sup>tomato</sup> mayor al haber más células en las fases G<sub>2</sub>M y S. (D) Representación gráfica de la de la viabilidad celular (derecha) y la proliferación celular de de las líneas celulares AB1 (azul) y AB1<sup>tomato</sup> (rojo)

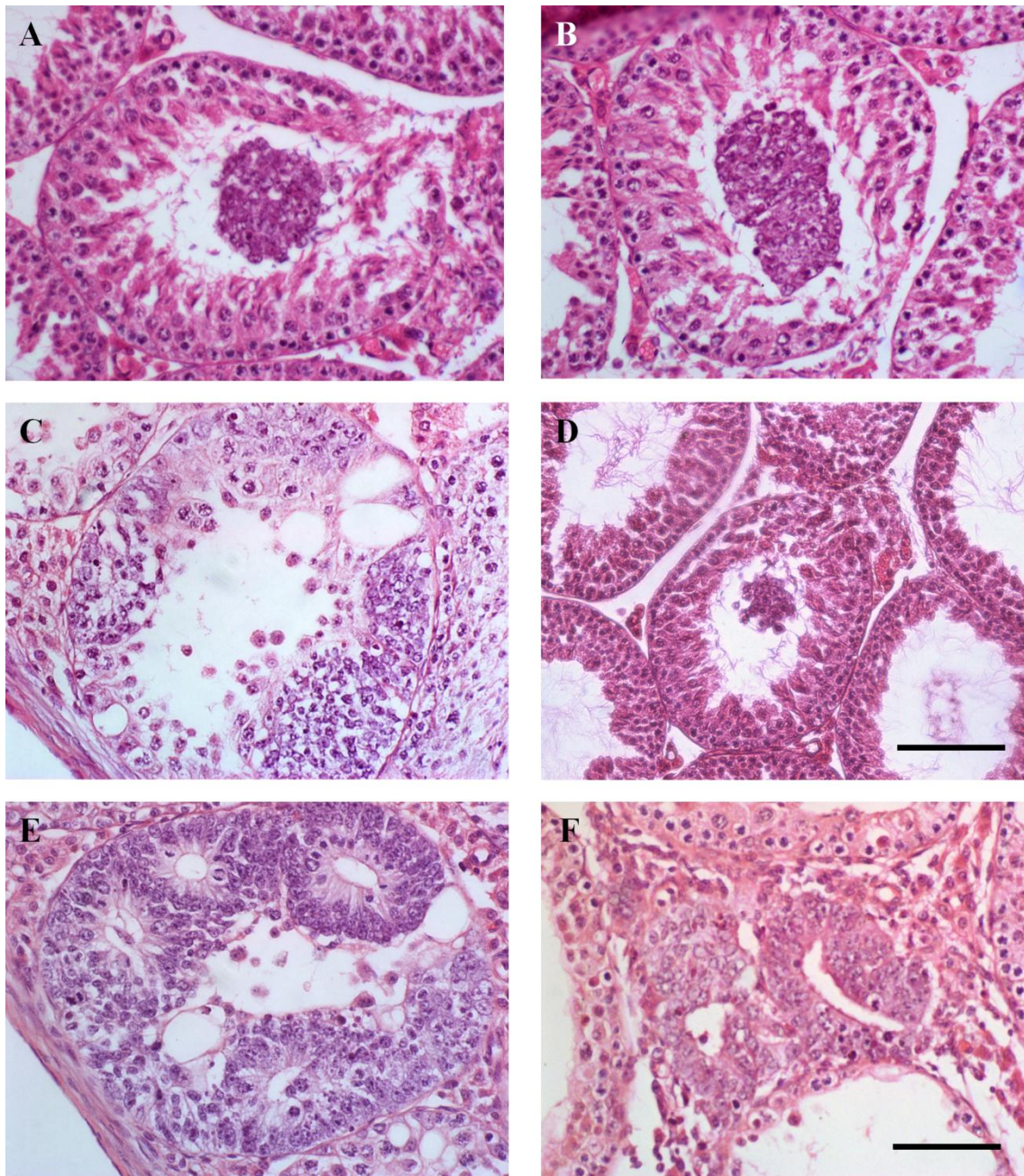


Fig. 34: Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina/Eosina de tumores experimentales a los 10 días del trasplante al interior de los túbulos seminíferos. (A, B yD) Agregados de células AB1<sup>tomato</sup> creciendo en la luz del túbulo. (C) Progresión intratubular. Proliferación de células tumorales sustituyendo al epitelio seminífero. (E) Teratocarcinoma intratubular con zonas de aspecto indiferenciado como tejido nervioso y epitelio. (F) Teratocarcinoma intersticial con áreas de aspecto indiferenciado como tejido nervioso y epitelio. Barra de escala 100μm.(D) y 50 μm (A,B,C,E,F)

## **DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

Los tumores derivados de células germinales del testículo (TGCTs) representan el tipo de tumor más frecuente entre los individuos de la población catalogados como jóvenes-adultos y cuya incidencia ha ido aumentando notablemente en las últimas décadas (Giwerzman *et al.*, 1993). A pesar de que la epidemiología de esta enfermedad es variable en función del grupo étnico, podría existir una relación directa con el estilo de vida y los cambios ambientales asociados a países industrializados que explicase este rápido aumento en la incidencia (McGlynn *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2007).

Históricamente, la investigación para entender la biología del cáncer se ha centrado principalmente en el estudio exclusivo de las células propias del tumor. Sin embargo, en los últimos años se han incrementado las líneas de investigación que muestran su interés en el conocimiento de los cambios que se producen en las células que rodean al tumor durante su desarrollo. Este grupo de células estrechamente relacionadas con el tumor es conocido como el estroma tumoral, siendo considerado hoy en día como un factor crucial en la regulación del crecimiento y desarrollo del tumor, consecuentemente, como un objetivo prometedor para las nuevas terapias dirigidas (Gonda *et al.*, 2010). Es por ello que el estroma reactivo que rodea los tumores se ha convertido en un factor clave para entender este crecimiento tumoral y los procesos asociados de invasión.

La mayor parte de las biopsias obtenidas de pacientes proceden en su mayor parte de TGCTs maduros por lo que resulta muy difícil estudiar las diferentes etapas de desarrollo que se producen en el humano. Es por ello que se han desarrollado modelos para la generación de tumores experimentales basados en el trasplante de células pluripotentes al interior de los túbulos seminíferos de ratón (Silván *et al.*, 2010) al existir grandes similitudes fenotípicas y de expresión entre las células madre embrionarias (ES) y el Carcinoma in situ (CIS), precursor común de los TGCTs (Almstrup *et al.*, 2004). A partir de los tumores formados en estos ensayos se ha podido describir en profundidad el origen y la estructura del patrón vascular presente en los teratocarcinomas experimentales, lo cual ha supuesto un importante avance para el estudio de los mecanismos de invasión y progresión de los tumores germinales (Silván *et al.*, 2009)

A pesar de que existen diversas investigaciones en las que proponen importantes implicaciones de las células mioideas peritubulares (PTCs) en el correcto desarrollo del

testículo, la fertilidad masculina o en el mantenimiento del nicho de las células madre de las espermatogonias (SSC) (Albrecht *et al.*, 2006; Mayerhofer *et al.*, 2013; Flenkenthaler *et al.*, 2014), el papel de estas células en el desarrollo de los tumores testiculares no ha recibido la atención que se merece, es por ello que en este trabajo las PTCs son presentadas como un componente del estroma reactivo asociado a los mecanismos de invasión y progresión en los TGCTs experimentales.

La mayoría de los estudios han sido realizados con células mioides peritubulares murinas ya que son mucho más fáciles de obtener que muestras patológicas inalteradas de cualquier paciente que se someta a una biopsia. En los ratones, estas células son menos abundantes ya que las PTCs se encuentran, por lo general, en una monocapa mientras que en los testículos humanos están organizadas en varias capas. En una primera aproximación, se aislaron PTCs a partir de pequeños fragmentos de túbulo seminífero tal y como se realiza en diferentes hospitales a partir de biopsias humanas (Albrecht *et al.*, 2006). Se pudo observar como estas células poseían una enorme capacidad para adherirse al fondo de la placa de cultivo y migar dejando tras de sí el pequeño fragmento de túbulo. Sin embargo, el volumen obtenido de células PTCs por este método no fue suficiente para la realización de la experimentación. Por ello, se adaptaron los protocolos basados en digestiones enzimáticas y adhesión diferencial a nuestro modelo en ratón. Estas técnicas de aislamientos que se llevan realizando en experimentación con PTCs de rata desde la década de los años 70 del siglo pasado (Tung & Fritz, 1977).

Uno de los principales problemas que posee el hecho de trabajar con células extraídas directamente del animal es la posibilidad de que aparezcan otros tipos celulares que alteren de manera significativa los resultados que se vaya a obtener, por lo que la caracterización de los cultivos primarios estableciendo la riqueza en PTCs presente en los mismos fue el primer aspecto a tener en cuenta. Para ello, se usó como marcador la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), un componente del citoesqueleto exclusivo de estas células en el estroma testicular junto con el endotelio de los capilares sanguíneos. Los resultados obtenidos tanto por inmunofluorescencia como por PCR de célula única indicaron que la pureza en PTCs de las células presentes en los cultivos era cercana a los porcentajes observados en la bibliografía (Tung & Fritz, 1990).

En el mantenimiento de la integridad de los tejidos, el papel que juega el estroma es fundamental. El estroma se encuentra compuesto por diferentes poblaciones celulares como por ejemplo fibroblastos, infiltraciones de leucocitos, linfocitos, macrófagos, capilares sanguíneos y sinusoides linfáticos que establecen una serie de interacciones en el microambiente tumoral que favorecen la progresión del tumor (De Wever *et al.*, 2008). En el caso del testículo, entre las respuestas que se producen por las alteraciones en el microambiente por la presencia de un TGCT se encuentra la transición epitelio-mesénquima (EMT). Durante este proceso los fibroblastos expresan  $\alpha$ -SMA, adquieren movilidad y características invasivas propias de una células mesenquimal además de una serie alteraciones de sus uniones intercelulares, así como cambios en la reorganización de su citoesqueleto (Yilmaz & Christofori, 2009). Es por ello que se decidió comprobar si los cultivos primarios de PTCs y la línea celular de fibroblastos embrionarios STO reaccionaban de una manera similar a la EMT en presencia de células madre embrionarias (ES) y células del carcinoma embrionario (ES).

Los experimentos de co-cultivo celular de la línea STO con las líneas AB1 (células ES), P19 y F9 (células EC) mostraron en todos los casos no sólo un incremento significativo en la velocidad de migración de los fibroblastos, también presentaron las células que formaban parte de frente de avance desorganizado y una morfología elongada. Estas características son típicamente mesenquimales junto con la pérdida en las uniones intercelulares. En cambio, el frente de avance en los ensayos de migración realizados con las células STO control progresaban de una manera más continua y ordenada, sin perder el contacto entre sí las células que lo componen. Este resultado indicaba que las células tumorales (células EC y ES) secretaban al medio una serie de factores que podrían reproducir la misma respuesta en los cultivos primarios de PTCs. Al llevar a cabo el ensayo de migración con las células PTCs, se observó que también veía aumentada de manera significativa la capacidad de migración de las PTCs tratadas con medios condicionados de células EC respecto a las PTCs control. Sin embargo, en esta ocasión el frente celular poseía una forma de avanzar más organizada que las de observada en los fibroblastos STO, sin observarse pérdidas en el contacto entre las células que lo conforman. Por lo que quizás, las causas por las que se produce un incremento en la velocidad de migración no deberían atribuirse a los cambios en el patrón de expresión en sus proteínas de adhesión célula-célula tales como la E-cadherina y la N-cadherina (Cavallaro *et al.*; 2002). El cambio de E- a N- cadherina es uno de los

procesos característicos durante la EMT (Rogers et al., 2013). Por lo que sería interesante analizar este posible evento en los cultivos de fibroblastos ya que se encuentra descrito previamente que la sobrerregulación de N-cadherina aumenta la invasión celular, la progresión tumoral y la metástasis en distintos tipos de carcinoma (De Wever et al., 2004; Tanaka et al., 2010; Lade-Keller et al., 2013). Recientemente, se ha podido describir que las PTCs presentan unos sistemas interconectados de actina y miosina en dos capas perpendiculares independientes (Losinno et al., 2012) cuya estructura y niveles de expresión podrían verse alterados y cuyo resultado podría traducirse en un aumento en la motilidad, por lo que los diferentes productos de secreción de las células tumorales podrían influir en la organización de estas proteínas citoplasmáticas en el caso de las PTCs lo que les proporcionaría un aumento en su capacidad de migración. No obstante, profundizar en el estudio de las variaciones en la expresión de las proteínas que interviene en las uniones intercelulares sería muy interesante en futuras investigaciones.

Para descartar el que el efecto observado en los ensayos de migración podría ser una consecuencia del aumento en las tasa de proliferación de los cultivos, se realizaron experimentos de citometría de flujo para analizar el perfil del ciclo celular de las células PTCs sin observarse diferencias significativas entre los cultivos de PTCs control y PTCs tratadas con MC de F9. Estos experimentos de citometría se complementaron con recuentos celulares llevados a cabo con los fibroblastos STO, los cuales tampoco vieron aumentada su tasa de proliferación cuando eran tratados con medios condicionados por células ES o EC. Este resultado no era el esperado teniendo en cuenta la histología de los TGCTs experimentales desarrollada por Silván et al., (2010), donde alrededor de los tumores, la expresión de actina de músculo liso se localizaba formando paredes de un grosor muy superior al de las capas de miofibroblastos presentes en los testículos control.

Una de las principales funciones de las PTCs junto con las células de Sertoli, es la secreción de componentes de membrana basal. Esta membrana basal, posee una función estructural crucial para la propia formación del túbulo durante el desarrollo testicular (Konrad et al., 2000b; Weber et al., 2002). En el contexto del microambiente tumoral, es de suponer que la capa de células PTC formaría una barrera física que contendría la invasión del mesénquima por parte de las células del carcinoma durante las primeras



fases de invasión. Debido a la proximidad física a la que se encuentra el CIS y la semejanza fenotípica de las PTCs a los miofibroblastos se decidió estudiar una actividad secretora de las PTCs en presencia de factores derivados del tumor, cuya alteración en la función podría contribuir de manera significativa a la progresión y el desarrollo de los TGCTs (Díez-Torre *et al.*, 2011).

Entre las MMPs más estudiadas en los procesos de invasión tumoral se encuentran las gelatinasas MMP-2 y MMP-9. Estas MMPs son capaces de degradar el colágeno, la proteína más abundante de la matriz extracelular, lo cual resultó de especial interés el estudio de la expresión de estas dos enzimas en los cultivos primarios de PTCs. Según muestran los resultados obtenidos mediante zimografías en geles de poliacrilamida con gelatina, la MMP-2 es una gelatinasa secretada de manera constitutiva, detectándose claramente su actividad en los medios condicionados por los cultivos de PTC control. En cambio, la actividad de la MMP-9 apareció de manera tenue cuando los cultivos eran tratados con medios condicionados durante 24 horas por células EC. En cambio, cuando ambos tipos celulares se cultivaban en contacto directo, aparecía la banda correspondiente a la forma activa de la gelatinasa MMP-9 de forma evidente. Este resultado nos señala el papel clave de la interacción entre las PTCs y carcinoma embrionario en el que se regula la expresión y la activación de la gelatinasa MMP-9 por parte del TGCT en las células PTC.

Numerosos estudios relacionan a las gelatinasas MMP-2 y la MMP-9 con el crecimiento, malignización y la capacidad metastática de los tumores (Itoh *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006). Es por ello que los patrones de expresión de ambas MMPs han sido ampliamente estudiados en diferentes modelos (Roomi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007), destacando especialmente la expresión de MMP-9 en el estroma asociado al desarrollo y progresión de cáncer de mama (Wu *et al.*, 2014; Mehner *et al.*, 2014). Para continuar profundizando en las gelatinasas secretadas por las PTC se analizaron mediante RT-PCR la expresión de su expresión para corroborar la actividad observada en los medios. El gen de MMP-9 se expresaba en mayor medida cuando los cultivos de PTC eran tratados con medio condicionado por células EC, mientras que la expresión de MMP-2 parecía mantenerse constante. El estudio en detalle de la expresión por Q-PCR confirmó claramente el aumento en la expresión de MMP-9 mientras que la expresión de MMP-2

mostraba una variabilidad intraexperimental que no pudo apreciarse previamente en los resultados de zimografía ni en la amplificación de su mRNA por PCR convencional.

Esta variabilidad en la expresión de MMP-2 puede ser debida a las limitaciones *per se* que supone el hecho de trabajar con cultivos primarios. También es posible que los factores solubles secretados por las células EC no posean una concentración constante en los medios utilizados o que las moléculas responsables sean lábiles podrían ser la causa de no encontrar diferencias significativas en la expresión de MMP-2. La necesidad de una secreción constante de factores proinvasivos para conseguir alterar el estroma tumoral por parte de las células del carcinoma embrionario podría explicar las diferencias que se siempre se observaron entre la concentración de MMP-9 activa en los medios de PTC tratados con medios condicionados de EC respecto a los medios procedentes del co-cultivo de ambos tipos celulares. En este último caso, la molécula responsable estaría siendo secretada de manera continua por las células EC, lo cual se traduciría en un estímulo constante que se ve reflejado en la mayor concentración de MMP-9 activa cuando las células PTC y EC interaccionan mediante contacto directo. Estos resultados se contrastarían con el análisis realizado por Singer *et al.*, (2002) de las interacciones que se producen en el estroma derivado de biopsias de tumores mamarios, cuyo frente de invasión manifestaba un patrón de expresión de MMP-2 y MMP-9 similar al observado en nuestro modelo. Así mismo, también se ha descrito diferencias entre el contacto directo y el efecto de factores difusibles durante la interacción entre fibroblastos y células tumorales durante el proceso de transición a miofibroblastos asociados al tumor en los que el contacto directo es necesario ya que las moléculas responsables poseen una vida media corta (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010)

Estos resultados demostrarían la participación de las PTCs en el aumento de la secreción gelatinasa MMP-9 en el modelo de co-cultivo celular desarrollado en el laboratorio, pero no serían suficientes para descartar una posible participación de las células EC en la secreción de MMP-9 cuando se encuentran en contacto con las PTCs. Ya que los monocultivos de células EC, al igual que los monocultivos de PTCs secretan por separado únicamente MMP-2 al medio.

Para confirmar la fuente de MMP-9 se llevaron a cabo inmunofluorescencias anti-MMP-9 sobre los co-cultivos de PTCs y células EC, detectándose la positividad para

dicha proteína en el citoplasma de las células PTCs, y más concretamente en las zonas adyacentes a las células del carcinoma embrionario. Confirmando en este modelo que lo observado en su momento por Sato *et al.* (2004) en co-cultivos de fibroblastos y células tumorales de la línea MCF-7, donde las células del estroma eran los principales responsables de la expresión de metaloproteasas en el frente de invasión.

Existen identificadas un gran número de citoquinas derivadas de células tumorales como posibles candidatas que inducen la expresión y secreción de MMPs en células del estroma. Por ejemplo, se ha descrito este efecto en las moléculas tales como PDGF, EGF, TGF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  sobre fibroblastos cultivados *in vitro* (Zempo *et al.*, 1996; Ganser *et al.*, 1991; Siwik *et al.*, 2000). Entre estas moléculas, la citoquina TNF- $\alpha$  resultaba de especial interés ya una molécula que se encuentra presente en el microambiente testicular donde es secretada, principalmente los mastocitos y macrófagos localizados en el mesénquima. Además se ha descrito efecto regulador de este TNF- $\alpha$  secretado por las células del sistema inmune del testículo en la secreción de diferentes productos por parte de las PTCs (Schell *et al.*, 2008). Hay que añadir que TNF- $\alpha$  también se encuentra ampliamente descrito como una molécula promigratoria ya de células madre mesenquimales (MSC) (Ponte *et al.*, 2007).

Estas dos características del TNF- $\alpha$  se ajustaban a los resultados obtenidos en la experimentación con PTCs, por lo tanto se decidió comprobar si el TNF- $\alpha$  derivado de las células del tumor era el principal responsable del aumento de la migración en las PTCs y el incremento en la expresión y secreción de MMP-9.

Al ser tratados los cultivos de PTCs con TNF- $\alpha$  comercial, se observó una relación dosis-dependiente entre la concentración de TNF- $\alpha$  y la liberación al medio de MMP-9 por parte de las PTCs. Sin embargo, los experimentos de *wound healing* no mostraron incremento alguno en la capacidad de migración cuando los cultivos de PTCs tratados con TNF- $\alpha$  respecto a los cultivos de PTC control. Por lo que este resultado abriría una vía paralela para la investigación de otras posibles moléculas como responsables principales en la estimulación de la migración en las PTCs. Por ejemplo el GDNF, IGF-I, o las interleucinas IL-6 o IL-8 entre otras moléculas (Xinaris *et al.*, 2013; Yew *et al.*, 2011).

Se continuó profundizando en la relación del TNF- $\alpha$  en el microambiente tumoral y su efecto sobre las células las PTCs con la realización de los inmunoensayos para esta molécula con los medios condicionados procedentes de la experimentación. Los resultados del ELISA mostraron ya existía una concentración basal de TNF- $\alpha$  en los cultivos PTC control mientras que sorprendentemente, el ELISA también reveló que en los medios condicionados por las células EC no se existía TNF- $\alpha$ . Este resultado contradujo la hipótesis inicial planteada sobre una posible relación unidireccional entre el incremento de la expresión de MMP-9 por parte de las células PTCs en respuesta al TNF- $\alpha$  derivado de las células del tumor.

A la luz de este nuevo resultado, surgieron dudas que cuestionaban la pureza de los cultivos primarios utilizados, debido a las concentraciones de TNF- $\alpha$  detectadas en los medios control de PTCs, cuya explicación se encontraría en la contaminación por parte de células del sistema inmune en los cultivos primarios (Schell *et al.*, 2008). Estas células serían las que se activarían e incrementarían su secreción de TNF- $\alpha$  tanto en los cultivos primarios de PTCs tratados con medios condicionados de células EC como en los co-cultivos en los que se produce un contacto directo entre ambos tipos celulares. Para comprobar esta suposición, igual que se realizó anteriormente con la comprobación de la fuente de MMP-9 en los cultivos, se realizaron inmunofluorescencias que localizaron al tipo celular que secretaba el TNF- $\alpha$  en los co-cultivos. Y, curiosamente en esta ocasión, la principal fuente de TNF- $\alpha$  resultaron ser las células tumorales en contacto directo con las células PTC. También se debe mencionar que la positividad observada en el TNF- $\alpha$  de los cultivos PTC control justificaban la señal detectada por el ELISA que ponía en cuestión la pureza de los cultivos primarios.

Estas observaciones no descartan completamente al TNF- $\alpha$  como responsable de las respuestas observadas en las PTCs tratadas con los medios condicionados pero si abren la puerta a la participación de otras moléculas que podrían modular el comportamiento de las PTCs durante las primeras fases de invasión por parte de los TGCTs, en las cuales todavía la integridad de la membrana basal no se encuentra completamente degradada (Fig. 35).

El modelo de co-cultivo presentado en esta Tesis Doctoral podría resultar de interés en el estudio del comportamiento de las PTCs durante el proceso de transformación de CIS

testicular a TGCT invasivo en esas las primeras etapas de la invasión del mesénquima por parte de las células tumorales, ya que debido a la particular localización de estas células al ser las primeras con las que interaccionaría el frente de invasión tumoral las atribuye una especial relevancia.

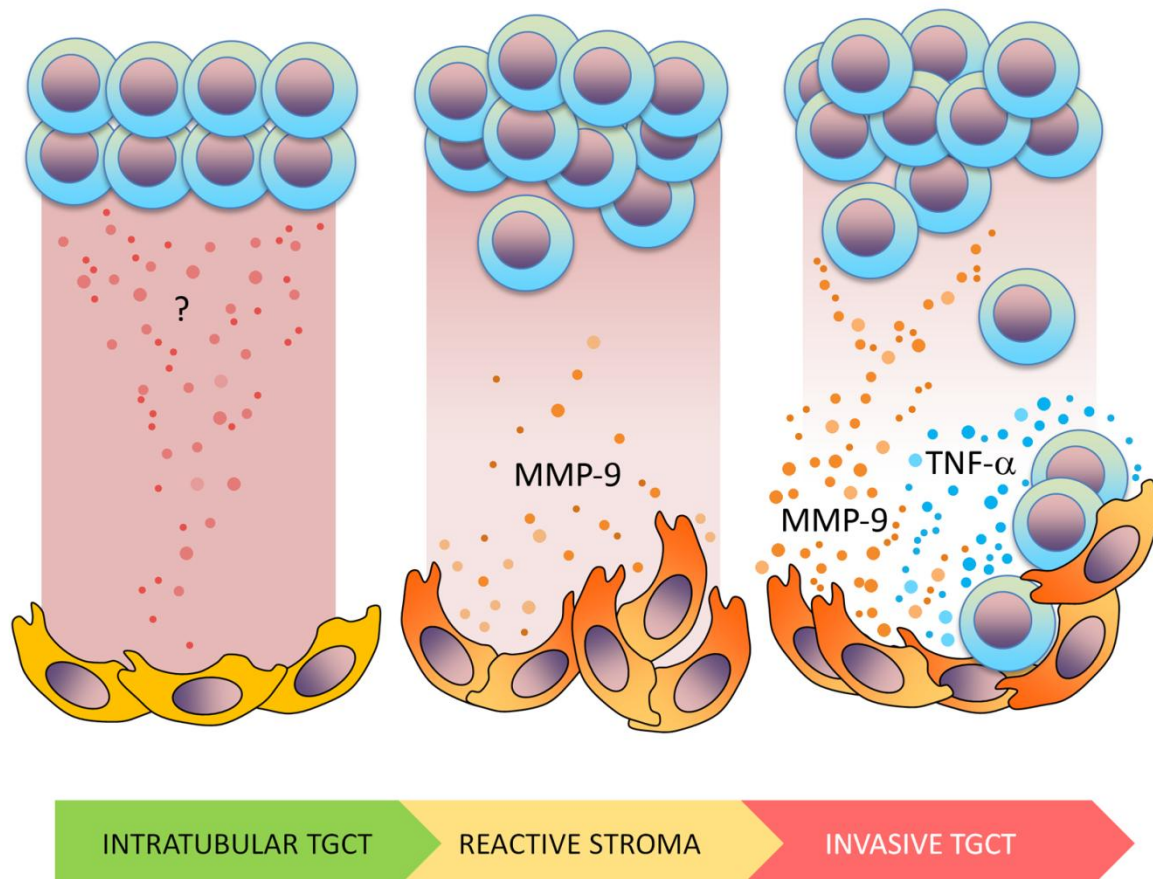


Fig. 35: Las células del tumor en la fase intratubular secretan factores difusibles a través de la membrana basal que modifican e inducen una respuesta en las PTC, incrementando su capacidad migratoria y provocando la secreción de MMP-9, que contribuye a la digestión de componentes de la membrana basal. Además las PTC comienzan a secretar TNF- $\alpha$ , lo que incrementa la secreción de MMP-9. En la fase inicial de invasión, algunas células EC consiguen atravesar la membrana basal produciéndose el contacto entre PTC y EC, lo que dispara la secreción de TNF- $\alpha$  por parte de las EC, provocando un aumento en la secreción de MMP-9 por las PTC.

En esta Tesis Doctoral se presenta también como resultados preliminares una aproximación *in vivo* de las primeras etapas en el proceso de invasión de los TGCTs experimentales.

La técnica que se llevó a cabo para la generación de tumores experimentales se basa en el trasplante de células madre embrionarias AB1 al interior del túbulo seminífero. Este modelo había sido optimizado y establecido en el laboratorio para el estudio *in vivo* del patrón y arquitectura vascular de los TGCTs maduros (Silván *et al.*, 2010). A pesar de que la intención era estudio de las primeras etapas de invasión, se consideró importante marcar las células que se iban a microinyectar para realizar así un seguimiento más preciso de la evolución de los tumores. En esta ocasión no se marcó la línea de células madre embrionarias AB1 mediante la proteína verde fluorescente (pEGFP), en su lugar se eligió la proteína fluorescente DsRed para llevar a cabo la transfección con ayuda del plásmido ptd-Tomato-N1. Una vez establecida la línea fluorescente AB1<sup>tomato</sup> se realizaron comprobaciones de algunas características del cultivo, para compararlas con las células de la línea original sin transfectar, ya que bibliografía recoge diversas incompatibilidades de este marcador con ciertos tipos celulares debido a su estructura tetramérica (Long *et al.*, 2005).

Se observó que la nueva línea celular mantenía un aspecto similar a los cultivos de las AB1 originales, formando colonias redondeadas y cuyas células presentaban intensidades de fluorescencia variable. A continuación se comprobó el ritmo de proliferación de las nuevas células madre embrionarias AB1<sup>tomato</sup> mediante el ensayo de MTT de viabilidad que junto con el estudio del perfil del ciclo celular obtenido por citometría de flujo, demostraron que las células recién transfectadas poseían un mayor ritmo proliferativo. Esta característica puede encontrar su explicación al método de selección llevado a cabo tras la transfección, pues la línea AB1<sup>tomato</sup> se amplificó a partir de una única colonia de cultivo que podría poseer un ritmo proliferativo mayor. Así mismo, el antibiótico de selección utilizado para el mantenimiento de estos cultivos podría ejercer algún tipo de estímulo en su capacidad de proliferación.

Trascurridos 10 días desde el momento en el que se realiza el trasplante al interior de los túbulos seminíferos, se procedió a analizar las diferentes secciones histológicas. Sorprendentemente, se localizaron cuatro formas de masas tumorales de las cuales tres

neoplasias eran intratubulares y la tercera se forma era un teratocarcinoma intersticial en proceso de diferenciación.

La primera masa intratubular observada fueron colonias de AB1<sup>tomato</sup> creciendo en la luz del túbulo seminífero. En todas las formaciones de este tipo, se puede apreciar una orientación de la masa celular hacia las zonas más desestructuradas del epitelio seminífero, lo cuales podrían representar las zonas de invasión de la mesénquima testicular por parte del tumor.

La segunda neoplasia encontrada en el interior de los túbulos correspondía a un teratocarcinoma en crecimiento y proceso de diferenciación neural, apreciándose una formación similar a los tubos neurales con epitelio ciliado. Así mismo, se identificaron numerosas figuras mitóticas asociadas.

Finalmente, también se localizó en el interior del túbulo zonas en las cuales el epitelio seminífero estaba completamente sustituido por células con elevada tasas de proliferación propia de un tumor.

Por otro lado, en la zona intersticial del testículo se localizaron pequeños focos de teratocarcinomas en proceso de diferenciación neural con estructuras ciliadas, semejantes a las comentadas anteriormente.

El objetivo principal de esta aproximación experimental *in vivo* era la obtención de alguna pista que nos indicase la reacción de las PTCs en las primeras fases de invasión tumoral en este modelo. Sin embargo, en ninguna de las formaciones intratubulares se observaron acumulaciones de matriz extracelular y tampoco capas de células intentando asilar del resto del organismo (De Wever & Mareel, 2003; Desmoulière *et al.*, 2004). Y en cuanto a los posibles cambios en las PTCs asociadas a las zonas donde el epitelio seminífero estaba completamente sustituido por las células tumorales,

Al menos estructuralmente, parece que la PTCs mantienen la integridad de la barrera que forman en el túbulo.

Estos resultados deberían completarse en un futuro con marcajes de tinción específica para  $\alpha$ -SMA, colágeno o MMPs así como algún marcador de proliferación lo cuales,

aumentarían la información que se ha obtenido de las primeras fases de invasión a los 10 días de realizar la microinyección.

No obstante, estas observaciones *in vivo* junto con los resultados obtenidos en nuestros modelos de co-cultivo celular fundamentan el interés que ha suscitado recientemente el estudio de la reacción de las PTCs como parte del estroma testicular durante el desarrollo de los TGCTs. Abriendo un nuevo camino para profundizar en la identificación tanto de las células inductoras como de las inducidas por los cambios derivados de la presencia del tumor, determinando los factores implicados en dichos procesos.



## **CONCLUSIONES**

## **6. CONCLUSIONES**

1. Las células de carcinoma embrionario (EC) inducen de la migración de las células mioides peritubulares (PTCs).
2. El medio condicionado de las células EC incrementa en las PTCs la expresión de la gelatinasa MMP-9 y estimula su secreción medio, siendo mayor cuando las células EC y las PTCs se encuentran en contacto directo. La expresión y secreción de la gelatinasa MMP-2 presenta una variabilidad menor.
3. El Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) induce la secreción de MMP-9 en los cultivos de células PTC de una manera dosis-dependiente. No obstante, no influye de forma directa en el incremento de la capacidad de migración de las PTCs.
4. Los productos de secreción de las células EC aumentan la concentración de TNF- $\alpha$  en las los cultivos de PTCs. Cuando se produce un contacto directo entre las células EC y las células PTC, la secreción de TNF- $\alpha$  es inducida en las células EC.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**Ahmad A, Hanby A, Dublin E, Poulson R, Smith P, Barnes D, Rubens R, Anglard P & Hart I.** (1998) Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. *Am J Pathol* 152: 721-728.

**Ailenberg M, Tung PS, Pelletier M & Fritz IB.** (1988) Modulation of Sertoli cell functions in the two-chamber assembly by peritubular cells and extracellular matrix. *Endocrinology* 122: 2604–2612.

**Albrecht M, Rämisch R, Köhn FM, Ullrich Schwarzer J & Mayerhofer A.** (2006) Isolation and Cultivation of Human Testicular Peritubular Cells: A New Model for the Investigation of Fibrotic Processes in the Human Testis and Male Infertility. *JCEM* 91:1956–1960.

**Almstrup K, Sonne SB, Hoei-Hansen CE, Ottesen AM, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Leffers H & Rajpert-De Meyts E.** (2006) From embryonic stem cells to testicular germ cell cancer - should we be concerned? *Int J Androl* 29, 211–218.

**Anthony CT, Kovacs WJ & Skinner MK.** (1989) Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with a microassay that uses an affinity ligand. *Endocrinology* 125: 2628–2635.

**Barsky SH, Siegel GP, Jannotta F & Liotta LA.** (1983) Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 49:140-147.

**Berstine EG, Hooper ML, Grandchamp S & Ephrussi B.** (1973) Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *PNAS* 70:3899-3903.

**Bokemeyer C, Harstrick A, Schoffski P, Schmoll HJ & Poliwoda H.** (1992) Germ-cell tumors of the testis. The epidemiological and etiological aspects. *Dtsch med Wochenschr* 117:1532-1537.

**Balanathan P, Williams ED, Wang H, Pedersen JS, Horvath LG, Achen MG, Stacker SA & Risbridger GP.** (2009) Elevated level of inhibin  $\alpha$  subunit is pro-tumorigenic and pro-metastatic and associated with extracapsular spread in advanced prostate cancer. *Br J Cancer* 100: 1784–1793.

**Barsky SH, Siegel GP, Jannotta F & Liotta LA.** (1983) Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 49: 140-147.

**Bérubé M, Deschambeault A, Boucher M, Germain L, Petitclerc E & Guérin SL.** (2005) MMP-2 expression in uveal melanoma: differential activation status dictated by the cellular environment. *Mol Vis* 11:1101-1111.

**Bonuccelli G, Avnet S, Grisendi G, Salerno M, Granchi D, Dominici M, Kusuzaki K & Baldini N.** (2014) Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells. *Oncotarget* 5:7575-7588.

**Carstens JL, Shahi P, Van Tsang S, Smith B, Creighton CJ, Zhang Y, Seamans A, Seethammagari M, Vedula I, Levitt JM, Ittmann MM, Rowley DR & Spencer DM.** (2014) FGFR1-WNT-TGF- $\beta$  signaling in prostate cancer mouse models recapitulates human reactive stroma. *Cancer Res* 74:609-620.

**Cavallaro U, Schaffhauser B & Christofori G.** (2002) Cadherins and the tumor progression: is it all in a switch?. *Cancer Lett* 176: 123-128.

**Benavides FJ & Guénet JL.** (2003) Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios Básicos y Aplicaciones (eds Universidad de Alcalá de Henares):105-136.

**Chia VM, Quraishi SM, Devesa SS, Purdue MP, Cook MB & McGlynn KA.** (2010) International trends in the incidence of testicular cancer 1973–2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 1151–1159.

**Chiarenza C, Filippini A, Tripiciano A, Beccari E & Palombi F.** (2000) PDGF-BB stimulates hypertrophy of peritubular smooth muscle cells from rat testis in primary cultures. *Endocrinology* 141: 2971–2981.

**Cooper DE, L'Esperance JO, Christman MS & Auge BK.** (2008) Testis cancer: a 20-year epidemiological review of the experience at a regional military medical facility. *J Urol* 180: 577– 582.

**Damjanov I.** (1993) Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int J Dev Biol* 37: 39-46.

**Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF & Seidl K.** (1990) Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 262: 253–261.

**DeClerck YA & Imren S.** (1994) Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur J Cancer* 30: 2170-2180.

**De Wever O, Demetter P, Mareel M & Bracke M.** (2008) Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 123:2229-2238.

**De Wever O, Hendrix AN, De Boeck A, WestBroek W, Braems G, Emami S, Sabbah M, Gespach C & Bracke M.** (2010) Modeling and quantification of cancer cell invasion through collagen type I matrices. *Int J Dev Biol* 54: 887-896.

**De Wever O & Mareel M.** (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J. Pathol.* 200:429-447.

**De Wever O, Van Bockstal M, Mareel M, Hendrix A & Bracke M.** (2014) Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. *Sem Cancer Bio* 25:33-46.

**De Wever O, Westbroek W, Verloes A, Bloemen N, Bracke M, Gespach C, Bruyneel E & Mareel M.** (2004) Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding. *J Cell Sci* 117:4691-4703.

**Desmouliere A, Guyot C & Gabbiani G.** (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 48:509-517.

**Díez-Torre A, Silván U, Moreno P, Gumucio J & Aréchaga J.** (2011) Peritubular myoid cell derived factors and its potential role in the progression of testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 34:e252-265.

**El Ramy R, Verot A, Mazaud S, Odet F, Magre S & Le Magueresse- Battistoni B.** (2005) Fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF9 mediate mesenchymal–epithelial interactions of peritubular and Sertoli cells in the rat testis. *J Endocrinol* 187:135–147.

**Evans MJ & Kaufman MH.** (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.

**Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Kleiner DE & Stetler-Stevenson WG.** (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218:325-329.

**Flenkenthaler F, Windschüttl S, Fröhlich T, Schwarzer JU, Mayerhofer A & Arnold GJ.** (2014) Secretome analysis of testicular peritubular cells: a window into the human testicular microenvironment and the spermatogonial stem cell niche in man. *J Proteome Res* 13: 1259-1269.

**Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM & López-Otín C.** (2004) Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 48:411-424.

**Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K & Sahai E.** (2007) Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 9:1392–1400.

**Ganser GL, Stricklin GP & Matrisian LM.** (1991) **EGF and TGF alpha influence in vitro lung development by the induction of matrix-degrading metalloproteinases.** *Int J Dev Biol* 35:453-461.

**Gialeli C, Theocharis AD & Karamanos NK.** (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 278:16-27.

**Giwercman A, Carlsen E, Keiding N & Skakkebaek NE.** (1993) Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. *Environ Health Perspect* 10:165-71.

**Gnessi L, Emidi A, Scarpa S, Palleschi S, Ragano-Caracciolo M, Silvestroni L, Modesti A & Spera G.** (1993) PDGF effects on purified testicular peritubular myoid cells: binding, cytosolic  $Ca^{2+}$  increase, mitogenic activity and extracellular matrix production enhancement. *Endocrinology* 133: 1880–1890.

**Gonda TA, Varro A, Wang TC & Tycko B.** (2010) Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin Cell Dev Biol* 21: 2–10.

**Greene MH, Kratz CP, Mai PL, Mueller C, Peters JA, Bratslavsky G et al.** (2010) Familial testicular germ cell tumors in adults: 2010 summary of genetic risk factors and clinical phenotype. *Endocr Relat Cancer* 17: 109–121.

**Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K & Scheurich P.** (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-802.

**Habashy HO, Powe DG, Staka CM, Rakha EA, Ball G, Green AR et al.** (2010) Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 119: 283–293.

**Hoashi T, Kadono T, Kikuchi K, Etoh T & Tamaki K.** (2001) Differential growth regulation in human melanoma cell lines by TIMP-1 and TIMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 288:371-379.

**Horwich A, Shipley J & Huddart R.** (2006) Testicular germ-cell cancer. *The Lancet* 367:754-765.



**Holstein AF, Maekawa M, Nagano T & Davidoff MS.** (1996) Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol* 59: 109–125.

**Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H & Itohara S.** (1998) Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58:1048-1051.

**Khokha R, Waterhouse P, Yagel S, Lala PK, Overall CM, Norton G & Denhardt DT.** (1989) Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science* 243:947-950.

**Konrad L, Albrecht M, Renneberg H & Aumuller G.** (2000a) Transforming growth factor-beta2 mediates mesenchymal–epithelial interactions of testicular somatic cells. *Endocrinology* 141: 3679–3686.

**Konrad L, Albrecht M, Renneberg H, Ullrich W, Hoeben E, Verhoeven G & Aumuller G.** (2000b) Mesenchymal entactin-1 (nidogen-1) is required for adhesion of peritubular cells of the rat testis in vitro. *Eur J Cell Biol* 79: 112–120.

**Koyama S.** (2004) Enhanced cell surface expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, and tumor-induced host response in progression of human gastric carcinoma. *Dig Dis Sci* 49:1621-1630.

**Lade-Keller J, Riber-Hansen R, Guldborg P, Schmidt H, Hamilton-Dutoit SJ & Steiniche T.** (2013) E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression. *Br J Dermatol* 169:618-628

**Long JZ, Lackan CS & Hadjantonakis AK.** (2005). Genetic and spectrally distinct in vivo imaging: embryonic stem cells and mice with widespread expression of a monomeric red fluorescent protein. *BMC Biotechnology* 5:20.

**Looijenga LH & Oosterhuis JW.** (2004) Clinical value of the X chromosome in testicular germ-cell tumors. *The Lancet* 263:6-8.

**Losinno AD, Morales A, Fernández D & Lopez LA.** (2012) Peritubular myoid cells from rat seminiferous tubules contain actin and myosin filaments distributed in two independent layers. *Biol Reprod* 86: 1-8.

**Mackay S & Smith RA.** (2007) Effects of growth factors on testicular morphogenesis. *Int Rev Cytol* 260: 113–173.

**Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Daumer KM, Milliman JN, Chiavarina B, Migneco G, Witkiewicz AK, Martinez-Cantarin MP, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Lisanti MP & Sotgia F.** (2010) Tumor cells induce the cancer associated fibroblast phenotype via caveolin-1 degradation: implications for breast cancer and DCIS therapy with autophagy inhibitors. *Cell Cycle* 2010 9:2423-2433.

**Mayerhofer A.** (2013) Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction* 145: 107-116.

**Maekawa M, Kamimura K & Nagano T.** (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* 59: 1–13.

**McBurney MW & Rogers BJ.** (1982) Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol* 89:503-508.

**McGlynn KA, Devesa SS, Graubard BI & Castle PE.** (2005). Increasing incidence of testicular germ cell tumors among black men in the United States. *JCO* 23:5757-5761.

**McMahon AP and Bradley A.** (1990) The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62:1073-1085.

**Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC & Radisky ES.** (2014) Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget* 5:2736-2749.

**Mimori K, Yamashita K, Ohta M, Yoshinaga K, Ishikawa K, Ishii H, Utsunomiya T, Barnard GF, Inoue H and Mori M.** (2004) Coexpression of matrix

metalloproteinase-7 (MMP-7) and epidermal growth factor (EGF) receptor in colorectal cancer: an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor is effective against MMP-7-expressing cancer cells. *Clin Cancer Res* 10:8243-8249.

**Mostofi FK & Sobin LH.** (1977) International histological classification of testicular tumors. In: *International Histologic Classification of Tumors* (Eds. World Health Organ) 16: 35-48.

**Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Friese K & Gerber B.** (2005) Inhibin/activin subunits (inhibin-alpha, -betaA and -betaB) are differentially expressed in human breast cancer and their metastasis. *Oncol Rep* 13: 81–88.

**Nabeshima K, Inoue T, Shima Y, & Sameshima T.** (2002) Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 52: 255-264.

**Nisato RE, Hosseini G, Sirrenberg C, Butler GS, Crabbe T, Docherty AJ, Wiesner M, Murphy G, Overall CM, Goodman SL & Pepper MS.** (2005) Dissecting the role of matrix metalloproteinases (MMP) and integrin alpha(v)beta3 in angiogenesis in vitro: absence of hemopexin C domain bioactivity, but membrane-Type 1-MMP and alpha(v)beta3 are critical. *Cancer Res* 65:9377-9387.

**Nuti E, Tuccinardi T & Rossello A.** (2007) Matrix metalloproteinase inhibitors: new challenges in the era of post broad-spectrum inhibitors. *Curr Pharm Des* 13:2087-2100.

**O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J & Moses MA.** (1999) Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem* 274:29568-29571.

**Palombi E Farini D, De Cesaris P & Stefanini M.** (1988) Characterization of peritubular myoid cells in highly enriched in vitro cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis.* (eds.: Cooke BA, Sharpe RM, New York) Raven Press 50: 311-317.

**Park S, Yoon SY, Kim KE, Lee HR, Hur DY, Song H, Kim D, Bang SI & Cho DH.** (2009) Interleukin-18 induces transferrin expression in breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Lett* 286: 189–195.

**Polette M, Gilles C, Marchand V, Seiki M, Tournier JM & Birembaut P.** (1997) Induction of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) expression in human fibroblasts by breast adenocarcinoma cells. *Clin Exp Metast* 15: 157–163.

**Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, Charbord P & Domenech J.** (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25:1737-1745.

**Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G & Kollias G.** (1995) Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11294-11298.

**Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A & Anand-Apte B.**(2003) A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 9 (4):407-415.

**Reed C, Fu ZQ, Wu J, Xue YN, Harrison RW, Chen MJ & Weber IT.** (1997) Crystal structure of TNF- $\alpha$  mutant R31D with greater affinity for receptor R1 compared with R2. *Prot Engineering* 10:1101–1107

**Romano F, Tripiciano A, Muciaccia B, De Cesaris P, Ziparo E, Palombi F & Filippini A.** (2005) The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. *Contraception* 72: 294–297.

**Romano F, Chiarenza C, Palombi F, Filippini A, Padula F, Ziparo E & De Cesaris P.** (2006) Platelet-derived growth factor-BB-induced hypertrophy of peritubular smooth muscle cells is mediated by activation of p38 MAP-kinase and of Rho-kinase. *J Cell Physiol* 207: 123–131.

**Richiardi L, Pettersson A & Akre O.** (2007) Genetic and environmental risk factors for testicular cancer. *Int J Androl* 30: 230–240.

**Ringold GM & Danielsen M.** (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *PNAS*. 84:7413-7417.

**Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M & Niedzwiecki A.** (2009) Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol Rep* 21:1323-1333.

**Rossi F, Ferraresi A, Romagni P, Silvestroni L & Santiemma V.** (2002) Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells *in vitro*. *Endocrinology* 143: 3096–3104.

**Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E & Seiki M.** (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65.

**Schell C, Albrecht M, Mayer C, Schwarzer JU, Frungieri MB & Mayerhofer A.** (2008) Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 149: 1678–1686.

**Schmalfeldt B, Prechtel D, Härting K, Späthe K, Rutke S, Konik E, Fridman R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W & Lengyel E.** (2001) Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7:2396-2404.

**Shah MN, Devesa SS, Zhu K & McGlynn KA.** (2007) Trends in testicular germ cell tumours by ethnic group in the United States. *Int J Androl* 30:206-213.

**Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M & Kubista E.** (2002) MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat* 72:69-77.

**Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY & Stetler-Stevenson WG.** (2003) TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell* 114:171-180.

**Silván U, Díez-Torre A, Andrade R, Arluzea J, Silió M & Aréchaga J.** (2011) Embryonic stem cell transplantation into seminiferous tubules: a model for the study of invasive germ cell tumors of the testis. *Cell Transplant* 20: 637-642.

**Silván U, Arluzea J, Andrade, R, Díez-Torre A, Silió M, Konerding MA & Aréchaga J.** (2009a) Angiogenesis and vascular network of teratocarcinoma from embryonic stem cell transplant into seminiferous tubules. *Br J Cancer* 101: 64-70.

**Silván U, Díez-Torre A, Arluzea J, Andrade R, Silió M & Aréchaga J.** (2009b) Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation* 78: 159-168.

**Silván U, Díez-Torre A, Jiménez-Rojo L & Aréchaga J.** (2010) Vascularization of testicular germ cell tumours: evidence from experimental teratocarcinomas. *Int J Androl* 33: 765-774.

**Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE & Sharp JJ.** (1997) Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 16:19-27.

**Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M & Kubista E.** (2002) MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat*: 69-77.

**Siwik DA, Chang DL & Colucci WS.** (2000) Interleukin-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Decrease Collagen Synthesis and Increase Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts *In Vitro*. *Circ Res* 86:1259-65.

**Stevens LC.** (1968) The development of teratomas from intratesticular grafts of tubal mouse eggs. *JEEM* 20:329-341.

**Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Tang B, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG & Roberts AB.** (2005) Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . *J Cell Sci* 118: 2143-2153.

**Stuelten CH, Busch JI, Tang B, Flanders KC, Oshima A, Sutton E, Karpova TS, Roberts AB, Wakefield LM & Niederhuber JE.** (2010) Transient tumor-fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF-Beta mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer. *PLoS One* 5:e9832.

**Svechnikov K, Petersen C, Sultana T, Wahlgren A, Zetterström C, Colón E, Bornestaf C, & Söder O.** (2004) The paracrine role played by interleukin-1 alpha in the testis. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4: 67-74.

**Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, Shimomura T, Fazli L, Wada R, Huang J, Vessella RL, An J, Horvath S, Gleave M, Rettig MB, Wainberg ZA & Reiter RE.** (2010) Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat Med* 16:1414-1420.

**Thewes M, Worret WI, Engst R & Ring J.** (2003) Stromelysin-3 (ST-3): immunohistochemical characterization of the matrix metalloproteinase (MMP)-11 in benign and malignant skin tumours and other skin disorders. *Clin Exp Dermatol* 24:122-126.

**Thomasset N, Lochter A, Sympton CJ, Lund LR, Williams DR, Behrendtsen O, Werb Z & Bissell MJ.** (1998) Expression of autoactivated stromelysin-1 in mammary glands of transgenic mice leads to a reactive stroma during early development. *Am J Pathol* 153:457-467

**Timmer A, Oosterhuis JW, Schraffordt Koops H, Sleijfer DT, Szabo BG & Timens W.** (1994) The tumor microenvironment: possible role of integrins and the extracellular matrix in tumor biological behavior of intratubular germ cell neoplasia and testicular seminomas. *Am J Pathol* 144: 1035–1044.

**Tung PS & Fritz IB.** (1977) Isolation and culture of testicular cells: a morphological characterization..*Techniques of Human Andrology. Amsterdam: (eds Elsevier/North Holland ,Hafez ESE) Biomedical Press.* 125-143.

**Tung PS & Fritz IB.** (1990) Characterization of Rat Testicular Peritubular Myoid Cells in Culture:  $\alpha$ -Smooth Muscle Isoactin Is a Specific Differentiation Marker. *Biol Reprod* 42: 351-365.

**Unemori EN, Hibbs MS & Amento EP.** (1991) Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines. *J Clin Invest* 88:1656-1662.

**Verhoeven G, Hoeben E & De Gendt K.** (2000) Peritubular cell-Sertoli cell interactions: factors involved in PmodS activity. *Andrologia* 32: 42–45.

**Vos CM, Van Haastert ES, De Groot CJ, Van der Valk P & De Vries HE.** (2003) Matrix metalloproteinase-12 is expressed in phagocytotic macrophages in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 138:106-114.

**Wajant H, Pfizenmaier K & Scheurich P.** (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65.

**Wang Z, Ahmad A, Li Y, Kong D, Azmi AS, Banerjee S & Sarkar FH.** (2010) Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression. *Biochim Biophys Acta* 1806: 122–130.

**Wang L, Luo J & He S.** (2007) Induction of MMP-9 release from human dermal fibroblasts by thrombin: involvement of JAK/STAT3 signaling pathway in MMP-9 release. *BMC Cell Biol* 8:14.

**Weber MA, Groos S, Aumuller G & Konrad L.** (2002) Post-natal development of the rat testis: steroid hormone receptor distribution and extracellular matrix deposition. *Andrologia* 34: 41–54.

**Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, López-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM & Parks WC.** (1999) Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286:113-117.

**Wu QW, Yang QM, Huang YF, She HQ, Liang J, Yang QL & Zhang ZM.** (2014) Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 in lymphatic invasiveness and metastasis of breast cancer. *PLoS One* 9:e97804.



**Xinaris C, Morigi M, Benedetti V, Imberti B, Fabricio AS, Squarcina E, Benigni A, Gagliardini E & Remuzzi G.** (2013) A novel strategy to enhance mesenchymal stem cell migration capacity and promote tissue repair in an injury specific fashion. *Cell Transplant* 22:423-436.

**Yan W, Zhang W, Sun L, Liu Y, You G, Wang Y, Kang C, You Y & Jiang T.** (2011) Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. *Brain Res* 1411:108-115.

**Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ & Fausto N.** (1997) Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U SA* 94:1441-1446.

**Yew TL, Hung YT, Li HY, Chen HW, Chen LL, Tsai KS, Chiou SH, Chao KC, Huang TF, Chen HL & Hung SC.** (2011) Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. *Cell Transplant* 20:693-706.

**Yilmaz M & Christofori G.** (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28:15-33.

**Yurchenko PD & Schitny JC.** (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 4: 1577-1590.

**Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ & Clowes AW.** (1996) Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by asynthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 6:28-33.

**Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenel-jenbogen BS & Hess RA.** (2002) Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 23: 870–881.

**Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY et al.** (2006) Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17718–17723.

## **PUBLICACIONES**

**Testis peritubular myoid cells (PTCs) increase their motility and express MMP-9 after interaction with embryonal carcinoma cells**

Journal:	<i>Andrology</i>
Manuscript ID:	ANDR-2015-0207
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	23-Jun-2015
Complete List of Authors:	<p>Moreno, Pablo; University of the Basque Country, Cell Biology and Histology</p> <p>Arluzea, Jon; University of the Basque Country, Cell Biology and Histology</p> <p>Silván, Unai; 3ETH Zürich, Institute for Biomechanics</p> <p>D?-Torre, Alejandro; University of the Basque Country, Cell Biology and Histology</p> <p>Andrade, Ricardo; University of the Basque Country, Cell Biology and Histology</p> <p>Bonilla, Zuriñe; University of the Basque Country, Cell Biology and Histology</p> <p>Díaz-Núñez, María; University of the Basque Country, Cell Biology and Histology</p> <p>Silió, Margarita; University of the Basque Country, Cell Biology and Histology</p> <p>Arechaga, Juan; University of the Basque Country, Cell Biology and Histology</p>
Key Words:	testis, testis cancer, testicular neoplasms, CIS testis

## Testis peritubular myoid cells (PTCs) increase their motility and express MMP-9 after interaction with embryonal carcinoma cells

P. Moreno-Ruiz<sup>1</sup>, J. Arluzea<sup>1,2</sup>, U. Silván<sup>3</sup>, A. Díez-Torre<sup>2</sup>, R. Andrade<sup>2</sup>, Z. Bonilla<sup>1</sup>, M. Díaz-Núñez<sup>1</sup>, M. Silió<sup>1</sup> and J. Aréchaga<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratory of Stem Cell, Development and Cancer*. Department of Cell Biology & Histology, Faculty of Medicine & Dentistry, University of the Basque Country (UPV/EHU). Leioa, Vizcaya, Spain

<sup>2</sup>*Analytical & High Resolution Biomedical Microscopy Core Facility*. University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Vizcaya, Spain

<sup>3</sup>ETH Zürich. *Institute for Biomechanics*, and University of Zürich, Balgrist University Hospital, Zürich, Switzerland

### Correspondence:

Prof. Dr. Juan Aréchaga. Laboratory of Stem Cell, Development and Cancer. Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country (UPV/EHU), E-48940 Leioa, Spain. E-mail: [juan.arechaga@ehu.es](mailto:juan.arechaga@ehu.es)

### Keywords:

Peritubular myoid cell, PTC, embryonal carcinoma cell, EC cell, teratocarcinoma, matrix metalloproteinase, MMP, MMP-9, cell migration, tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$

### SUMMARY

Here, we have studied the *in vitro* interactions between murine embryonal carcinoma (EC) cells and seminiferous peritubular myoid cells (PTCs), as a component of the primary invasive process exhibited by testicular germ cell tumors (TGCTs). Using primary cultures of murine PTCs and F9 embryonal carcinoma (EC) cells, MMPs were found to be secreted and PTCs migrated following interaction with EC cells. We examined in more detail the influence of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a cytokine that induced MMP-9 expression, but does not increase the migration capacity of PTCs. Our results provide evidence for a role played by PTCs during the early stages of TGCT progression.

## INTRODUCTION

The incidence of testicular germ cell tumors (TGCTs) has risen during the last decades (Cooper *et al.*, 2008; Chia *et al.*, 2010). Carcinoma *in situ* of the testis, CIS (Toppari, 2013) is generally considered to be the common precursor of the most frequent male germ cell tumor, i.e. a group that is classified as Type II TGCT in humans and that consists of seminoma and non-seminoma tumors (Oosterhuis & Looijenga, 2005). The important role of the cancerous reactive stroma and tumoral microenvironment has been described in the progression of a number of tumors, including breast cancer (Stuelten *et al.*, 2010), colon carcinoma (De Wever *et al.*, 2010; 2014), osteosarcoma (Bonucci *et al.*, 2014), prostate cancer (Carstens *et al.*, 2014) and testis germinal tumors (Diez-Torre *et al.*, 2004). Nevertheless, the precise mechanisms by which the tumor stroma affects TGCT progression still remain poorly understood.

In the healthy testis, peritubular myoid cells (PTCs) form a barrier that surrounds the seminiferous tubules and is in direct contact with the testis stroma. In addition to their structural function, these cells behave as active agents in the regulation of testicular homeostasis, through the secretion of different factors, including ECM components (Ailenberg *et al.*, 1988; Díez-Torre *et al.*, 2011). For instance, it has been shown that these smooth-muscle-like cells play important roles in human male fertility, in the paracrine regulation of the male gonad and in the establishment of the spermatogonial stem cell (SSC) niche (Albrecht *et al.*, 2006; Mayerhofer, 2013; Flenkenthaler *et al.*, 2014). Nevertheless, the potential of PTCs as a part of the TGCT together with the tumor reactive stroma, to be a source of proinvasive factors, remains unknown. Their physical proximity to CIS cells and their phenotypic resemblance to myofibroblasts suggest that these cells could contribute to TGCT growth and progression (Díez-Torre *et al.*, 2011).

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of endopeptidases that degrade ECM components such as collagen IV, laminin and fibronectin. Despite the fact that these enzymes have been a focus of oncology research, because of their potential as therapeutic target in other types of tumors (Nuti *et al.*, 2007; Gialeli *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2011), the role of these proteases in TGCT progression has not been elucidated in detail. At initial stages of TGCT development, the basement membrane of the seminiferous tubules constitutes a physical barrier that prevents carcinoma cells from invading the mesenchyme. Therefore, changes in the secretory activity of PTCs and their integrity could contribute to the progression from intratubular to invasive TGCTs. In contrast to MMP-2, which is constitutively expressed by PTCs, MMP-9 expression levels are usually low and elevated levels of MMP-9 have been reported to be associated with increased neoplastic progression and metastasis (Nabeshima *et al.*, 2002).

It has been reported that the crosstalk between cancer cells and stroma cells results in the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a factor known to display both tumor promoter and suppressor characteristics. The effect of this cytokine on the regulation of human testicular PTC secretory activity and its involvement in impaired spermatogenesis has been reported (Schell *et al.*, 2008). Additionally, this factor has been found to play a role in tumor stroma cross talk, causing the upregulation of MMP-9 (Stuelten *et al.*, 2005).

In the present study, we have examined the effect of factors secreted by embryonal carcinoma (EC) cells on the expression of metalloproteinases and on the migratory capacity of PTC. In our experiments we used primary cultures of freshly isolated PTCs from murine testis, and the F9 EC cell line to develop a 2D-coculture system to study this tumor-stroma interaction. Since expression of MMPs is highly regulated by cytokines, the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

effect of TNF- $\alpha$  also was assessed in this *in vitro* model.

For Peer Review

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of PTCs

Primary cultures of testicular peritubular myoid cells (PTCs) were prepared by a modification of previous methods of rat testicular cells isolation (Verhoeven & Cailleau, 1988; Palombi *et al.*, 1988). The testes from eight-week-old male Swiss mice were excised and decapsulated. Testicular tubules obtained were washed three times in phosphate buffer saline (PBS) containing 1% of antibiotics (Sigma<sup>®</sup>; 10,000U/ml penicillin and 10 mg/ml streptomycin in 0,9% NaCl) and allowed to settle under gravity. Seminiferous tubules were digested under gentle shaking at 37° for 15 minutes in Hanks' buffer containing 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma<sup>®</sup>). The digestion was stopped with fetal serum bovine. The supernatant was passed through a nylon cell strainer (BD Falcon<sup>™</sup> - 100µm mesh size) collected and centrifuged at 230g. Cell pellet was suspended and seeded in a 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Sarstedt<sup>®</sup>). After 72 h, non-adherent cells were discarded and adherent cells were thoroughly washed with PBS with antibiotics. The cultures were incubated for another 4 days. The primary culture monolayers were briefly trypsinized, and cells were seeded in several plates. After 6 hours, cultures were washed to enrich them in PTCs by differential adhesion and cultured for 4 days.

### Cell cultures

Primary cultures of PTCs isolated were used from passage 1 or 2. Mouse embryonal carcinoma cell line F9 (ECACC No.85060401) were purchased from European Collection of Cell Cultures, a Culture Collection of Public Health England (Salisbury, UK, <http://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.jsp>). F9 cells were seeded over a monolayer of peritubular myoid cells in a 25 cm<sup>2</sup> tissue flask. The total number of F9 cells per flask was 2.5 x 10<sup>5</sup> cells. As controls, monolayer of PTCs and monoculture of F9 were maintained at the same density and number of cells as in the co-cultures. The culture medium was DMEM (Lonza), with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and Penicillin 100 units/mL-Streptomycin 100µg/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37° C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Experiments were carried out with serum-free medium.

### Preparation of PTC and EC cell conditioned media

PTCs were seeded at 25 cm<sup>2</sup> tissue flasks in complete culture medium and were allowed to reach confluence. F9 cells were seeded at 2.5 x 10<sup>5</sup> cells per 25 cm<sup>2</sup> tissue flask and were incubated in complete culture medium for 2 days. In both cases, cultures were washed two times with PBS and incubated with new culture medium for 24 hours. Conditioned media were then harvested and filtered through a PES-membrane before using (Sarstedt; syringe filter Filtropur S 0.2 µm pore size).

### Migration assays

Wound assays were performed using the Ibidi Culture-Insert<sup>®</sup>, 70 µl of 3.5 x 10<sup>5</sup> cell/ml PTC suspension was applied into each well of the insert. PTCs were incubated at 37° C and 5% CO<sub>2</sub> in six-well plates and after appropriate cell attachment (24 hours), silicone inserts were gently removed resulting in a cell-free gap of approximately 500 µm. PTC monolayer was washed three times with PBS and incubated with complete culture medium (served as control) versus PTCs cultures with F9-CM. Digital photographs of wounds were taken at 0 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours. Wound front was traced in the photographs and wound area was calculated using an image analysis software (ImageJ 1.45; Area\_Calculator.java). The percentage of covered area was calculated as: [(image area – non-covered area)/image area]\*100

### Flow cytometric analysis

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Mouse testis PTCs cultures were harvested by washing with PBS and adding 0.02% EDTA and 0.025% trypsin; the cells were fixed with 70 % ethanol and aliquots of  $1 \times 10^6$  cells of PTCs untreated and treated with EC-conditioned media were incubated with propidium iodide (10  $\mu\text{g/ml}$ ) in presence of RNase A (250  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour at 4 °C; then cell cycles were analyzed with a FACScan (Beckman Coulter Gallios).

### Gelatin zymography

Serum free culture media harvested from primary cultures of PTC, F9 mouse embryonal carcinoma cells and co-cultures PTC-F9 were subjected to electrophoresis on 10% SDS polyacrylamide gel containing 1% gelatin (Calbiochem®). The gel was then washed in 2% X-100 (Sigma®) solution for 30 min. The gel was then incubated in MMP substrate buffer (pH 7.5) containing 6.06 g/L Tris-base, 1.47 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and 0.2 g/L  $\text{NaN}_3$  at 37° C o.n. The gel was stained with 0.1% Coomassie blue R-250 (Sigma®) for 20 min, then destained with the destaining solution composed of 20% methanol, 10% acetic acid diluted in water. Areas corresponding to MMP-2 and MMP-9 activity appeared as clear bands against a dark blue background. The bands were then quantified by optical densitometry (ImageJ 1.45 software; Densitometry\_1\_Channel\_.java)

### RNA isolation and retrotranscription

Total RNA was extracted with the RNeasy Mini kit (Quiagen®, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was used to generate first-strand complementary DNA (cDNA) with the iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad Hercules, CA, USA). The obtained cDNA solution was immediately used for polymerase chain reaction (PCR) or stored at -20 °C.

### Conventional RT-PCR

The analyzed genes and the sequences for primers used in the PCR are listed in Table 1. PCRs were performed with 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 10  $\mu\text{M}$  (1  $\mu\text{L}$ ) of each primer and 12.5  $\mu\text{L}$  MyTaq™ Extract-PCR Kit (Bioline) and 10.5  $\mu\text{L}$  (DEPC)-treated water in a final reaction volume of 25  $\mu\text{L}$ . Thermal cycling conditions were 95 °C for 3 min followed by 35 cycles with a 30 sec denaturation step (95 °C), a 30 sec annealing step (55 °C), and 30 sec extension step (72 °C). The PCR mixtures were electrophoresed at 90 V in a 2% agarose gel containing ethidium bromide.

### Quantitative PCR

The cDNA was used as a template for amplification and detection of MMPs expression by qPCR by utilizing intron-spanning primers (250 nM each) and performed with an ABI/PRISM 7900 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Each sample was normalized with RPL-13 as an internal control. The reaction mixture contained 35 ng total cDNA and 10- $\mu\text{l}$  reaction volume (SYBR Green PCR Reagent kit, Applied Biosystems) in a final reaction volume of 20  $\mu\text{L}$ . Thermal cycling conditions were as follows: an initial polymerase activation step at 95 °C for 3 min followed by 50 cycles with a 95 °C denaturation step (30 sec), a 55 °C annealing step (30 sec) and a 72 °C extension step (30 sec) during which data were collected.

Expression data generated were defined by the  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  relative quantification;  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  is the difference between the threshold cycle of a selected gene and a reference gene for the same sample. For each sample, real-time PCR was performed in triplicate. The sequences of the specific primers are indicated in Table 1. All primers were synthesized commercially (Jena Bioscience, Jena, Germany) and a BLAST search was performed to check the specificity of their DNA sequences. Determinations of statistical significance were performed by the ANOVA test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant (\*).



### Immunofluorescence

Primary cultures of peritubular myoid cells obtained as previously described were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature and permeabilized with Triton 0.2 % in PBS for 5 min. Samples were then incubated with 10% FCS in PBS for 1 h to block unspecific binding of the antibodies. After washing three times with PBS, cells were incubated at 4 °C overnight with a mouse IgG primary antibody against MMP-9 (Abcam 137867) diluted 1:300 or mouse IgG primary antibody against TNF- $\alpha$  (Sigma 4502982) diluted 1:300 in PBS-BSA 5% and a mouse IgG primary antibody against alpha-SMA (Sigma, A2547). Subsequently, cells were washed with PBS and incubated with corresponding goat secondary antibodies to mouse IgG-FITC (Santa Cruz, sc-2090), IgG-PE (Santa Cruz, sc-3768) and IgG-Alexa Fluor 555 (Life Technologies, A-21429) for 1 h at room temperature in the dark. After three washes with PBS, cells were incubated with Hoechst 33342 and stored at 4 °C until observed under APOTOME microscope (Zeiss, Germany). Negative controls were performed by omitting the primary antibody.

### TNF- $\alpha$ ELISA

Supernatants were collected from PTC cultures, PTC cultures stimulated with EC-conditioned media, F9 cultures and co-cultures of PTC and F9 cells. After 24 hours under serum-free conditions. The samples were used to study TNF- $\alpha$  concentrations. All samples were stored at -80 C until use. Measurement of secreted TNF- $\alpha$  levels was performed using Mouse TNF- $\alpha$  immunoassays (Life Technologies, Cat N° KMC3011) according to the manufacturer's protocol. Absorbance was measured at 450 nm wavelength using a BioTek photometer (BioTek Synergy HT; BioTek® Instruments, Vermont, USA). All measurements were performed at least in duplicate with cells from two different PTC extractions.

## RESULTS

### 1. Embryonal Carcinoma cells increase the expression and secretion levels of MMPs in PTCs

MMP-2 and MMP-9 expression in serum-free primary cultures of PTCs and in serum-free medium conditioned by F9 cells for 24 h (F9-CM) was assessed by RT-PCR and RT-qPCR. Standard PCR revealed an increment in MMP-9 mRNA expression in PTCs treated with conditioned media (Fig. 1A). Quantitative analysis confirmed a significant increment in the expression level of MMP-9 mRNA (Fig. 1B).

To analyze the secretion levels of both MMPs, gelatin-substrate zymography was employed to evaluate enzymatic activities (Fig. 1 C,D). PTC cultures and F9 cells cultured for 24 h under serum-free conditions released active MMP-2 (72 kDa), indicative of basal gelatinolytic activity (Fig. 1D, lanes 1,2), but did not release MMP-9 into the culture medium (Fig. 1C, lanes 1,2). When PTCs were treated with F9-CM, a band was seen at 92 kDa, which is consistent with the electrophoretic mobility of MMP-9 (Fig. 1C, lane 3). In those experiments in which F9 cells and PTCs were co-cultured, a clear increment of MMP-9 secretion was observed (Fig. 1C, lane 4). Even though MMP-2 gene expression increased in PTCs treated with F9-CM, this tendency was not observed at the secretion level.

MMP-9 immunofluorescence of cells stimulated with F9 cell conditioned medium revealed an increment in the number of small MMP-9 secretion vesicles in PTCs (Figure 2B). When both cell types were co-cultured, MMP-9 protein was highly expressed in PTCs, preferably in those areas adjacent to carcinoma cells.

### 2. EC-conditioned medium increases PTC migration

To test the ability of F9-preconditioned media to stimulate PTC migration, we performed wound healing assays (Fig. 3A). Results showed that F9-conditioned medium increases migration. After 24 hours, statistically significant differences were found in the area covered by PTCs; this area was almost completely sealed over after 72 hours.

We analyzed cell cycle profiles by means of cell cytometry (Fig. 3B) to exclude the possibility that increased proliferation might account for enhanced wound healing. No significant differences in cell cycle profile and total number of STO fibroblasts between control cultures and 24 h treated F9-CM cultures were found (data not shown). Taken together, these findings indicate that F9-CM stimulates myoepithelial (PTC) and stromal (STO) cell migration.

### 3. Soluble TNF- $\alpha$ induces the upregulation of MMP-9 mRNA expression and significantly increases the secretion of MMP-9 but not the migration capacity of PTCs

A variety of cytokines have been implicated in tumor-stroma crosstalk. We focused our attention on the influence of TNF- $\alpha$  in the TGCT microenvironment and its involvement in the reactive change of PTCs. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) revealed that PTC primary culture medium contains TNF- $\alpha$ . Furthermore, the concentration of TNF- $\alpha$  increased in PTCs incubated with EC-conditioned media and highly increased in co-cultures of EC-PTC cells (Fig. 4 A). Analysis of PTCs treated with 100 ng/ml TNF-alpha for 24 hours confirmed the upregulation of MMP-9 and MMP-2 at the mRNA level (Fig. 4B).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

When PTCs were cultured with different concentrations of TNF- $\alpha$  for 24 hours (1, 5, 25, 50 and 100 ng/ml), significant MMP-9 activity became apparent at 5 ng/ml TNF- $\alpha$  and it increased in a dose-dependent manner until 100 ng/ml. However, a similar effect was not observed regarding MMP-2 (Fig. 4C).

MMP-9 expression was also found by immunofluorescence in PTCs stimulated by TNF- $\alpha$  (25 ng/ml). More specifically, using indirect immunofluorescence, we observed an increment in the number of MMP-9 stained secretion vesicles (Fig. 2D)

Using immunocytochemistry to localize the source of TNF- $\alpha$  in EC and PTC co-cultures, we observed low or no TNF- $\alpha$  immunoreactivity in monocultures of PTC and F9 cells (Fig. 5 A,B), whereas co-cultures of PTCs and F9 cells showed high expression of TNF- $\alpha$  in both cell types (Fig. 5C).

It might appear reasonable to assume that addition of TNF- $\alpha$  to the culture serum-free medium would produce a migratory effect on PTCs. However, our wound healing experiments revealed that TNF- $\alpha$  is not a pro-migratory agent by itself, because this cytokine did not augment the migration capacity of PTC cultures at 5 ng/ml (Fig. 3C).

## DISCUSSION

Myofibroblasts, a stromal cell type characterized by the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), has been reported to be a critical factor in epithelial-mesenchymal crosstalk, playing a key role in invasive cancer growth (De Wever *et al.*, 2008). Interestingly, the healthy testis contains a peritubular population of fibroblastic  $\alpha$ SMA-positive cells, the so-called peritubular myoid cells (or PTCs), which have been hypothesized to favor testicular germ cell (TGCT) progression (Díez-Torre *et al.*, 2011). In fact, using an *in vivo* model of testicular teratocarcinomas based on the transplantation of embryonic stem cells into the seminiferous tubules of immunocompatible mice, we found an accumulation of this type of cell in mature tumors (Silván *et al.*, 2011a). In the present work, we aimed to study the molecular crosstalk between testicular PTCs and *in vitro* cultivated embryonal carcinoma (EC) cells, the stem cell population of TGCTs (Silván *et al.*, 2011b). In our experiments we used freshly isolated PTCs and the F9 EC cell line, which was originally isolated from an experimental carcinoma (Berstine *et al.*, 1973). The stability of the F9 karyotype, together with the inability of these cells to differentiate spontaneously, eliminating the requirement for supplementary factors that might alter the observations, thereby making this cell line appropriate for co-culture and 'conditioned-medium' studies (Alonso *et al.*, 1991).

Due to the importance of matrix metalloproteinases (MMPs) in many processes related to tumor invasion, we first analyzed the effect of F9-conditioned medium on the expression levels of MMP-2 and -9 in PTCs. Our experiments revealed an increase in both gelatinases, with differences in the case of MMP-9 being the only ones which were significant. Using gelatin zymography we were able to directly evaluate the proteolytic activities of MMP-2 and -9 in the PTC cultures, and, although large variability between experiments made quantification impossible, the tendency towards higher proteolytic activities in F9-PTC co-cultures and in PTCs cultured with medium conditioned by F9 cells was evident. Surprisingly, MMP-9 immunofluorescence revealed a heterogeneous distribution of MMP-9 secretion among different cells in the same culture plate. While some activated PTCs did contain MMP-9-positive vesicles in the perinuclear region of the cytoplasm, other cells completely lacked immunofluorescence. This variable impact of the soluble factors present in the conditioned medium might be explained by the presence of two or more subpopulations of PTCs in our cultures. Actually, the existence of different PTC types with distinct phenotypic characteristics has been described in human PTC samples (Davidoff *et al.*, 1990).

In *in vivo* situations, the increment in secreted MMP-9 might represent an indirect pathway used by EC cells to dismember the host tissues and facilitate tumor invasion (Johansson *et al.*, 2000). Because the activator of MMP expression is a soluble factor, and therefore contact between tumor cells and PTCs is not needed for the upregulation to happen, this mechanism probably participates in the initial steps of TGCT invasion. The importance of this first invasive event should not be underestimated, since it allows the entry of the malignant cell into the stromal compartment that contains testicular blood and lymphatic vessels, which are two paths followed by TGCTs to metastasize (Sesterhenn and Davis, 2004). In fact, a direct relationship between gelatinase expression in cell lines derived from germinal tumors and their invasiveness has been previously described (Milia-Argenti *et al.*, 2012), pointing to matrix degradation as a key event in the invasive process.

The previously reported increment in PTC proliferation rate in different pathological testicular processes such as those exhibited by TGCTs (Gnessi *et al.*, 1993; Chiarenza *et al.*, 2000), led us to expect an augmented proliferation rate in cells cultured in the presence of conditioned medium. Surprisingly, we did not find differences in the

1 proliferation rate of treated and untreated cells. This result indicates that direct contact with  
2 the tumor cells or a specific microenvironment (which is missing in our in vitro system),  
3 may be necessary for the induction of PTC proliferation. This observation further allowed  
4 us to analyze the collective migration of the treated PTCs without the need to inhibit their  
5 proliferation. The 'wound healing' assay showed a significantly higher migration rate of  
6 PTC cells cultured with conditioned media, in comparison with those cells that received  
7 normal medium. A chemotaxis-based PTC recruitment of myofibroblasts has been  
8 reported using human plasma fibronectin as chemoattractant (Kawamoto *et al.*, 1997). It  
9 would be therefore interesting to determine the directionality of single PTCs in the co-  
10 cultures, to unravel the mechanism by means of which these cells accumulate in solid  
11 tumors.  
12  
13

14  
15 The presence of significant amounts of TNF- $\alpha$  in the PTC-F9 co-culture medium and in the  
16 PTC cultures treated with F9 conditioned medium together with the relationship of this  
17 cytokine with MMP-9 regulation in other cellular systems (Yang *et al.*, 2004) led us to study  
18 the impact of this factor on PTCs, and examine its possible relationship with the previously  
19 observed effects of EC-secreted components. Our TNF- $\alpha$  and  $\alpha$ -SMA immunostaining  
20 experiments revealed that other cell types release this cytokine in normal testicular  
21 processes as previously described (Schell *et al.*, 2008; Suominen *et al.*, 2004).  
22 Nevertheless, co-cultures of PTCs and F9 demonstrated a direct contribution of both cells  
23 to achieve the concentrations of TNF- $\alpha$  needed to increment MMP-9 expression observed  
24 in PTCs. This result points to the necessity of other complementary factors or factor  
25 combinations for the regulation of MMP-9 expression in PTCs treated with F9-conditioned  
26 medium since MMP-9 immunofluorescence revealed a similar staining pattern in cells  
27 treated with TNF- $\alpha$  and those that received F9-conditioned medium. Although our  
28 experiments do not permit us to unequivocally conclude that TNF- $\alpha$  induces MMP-9  
29 expression in TGCTs, the presence of increased amounts of TNF- $\alpha$  in F9-PTC co-cultures,  
30 and the previously described upregulation of MMP-9 in specific areas of experimental  
31 TGCTs (Silván *et al.*, 2010), point to TNF- $\alpha$  as an important player in TGCT development  
32 and progress.  
33  
34  
35

36 On the other hand, TNF- $\alpha$  did not change the migration velocity of PTCs, pointing to other  
37 factors, or factor combinations as being responsible for the increase in cell migration  
38 speed observed in our previous experiments. In this regard, it would be interesting to  
39 analyze the effect of TNF- $\alpha$  and conditioned media on PTC migration using different  
40 substrates, and compare, for instance, the results obtained on collagen (as a model of  
41 healthy tissue), and on a mixture of fibronectin and degraded collagen as a representation  
42 of malignant extracellular matrix (Hagedorn *et al.*, 2001).  
43  
44

45 In conclusion, we have demonstrated here that our in vitro co-cultures of tumor cells and  
46 PTCs exhibit part of the cross-talk which takes place between tumor and PTCs to regulate  
47 MMP-9 expression, emphasizing the important role of TNF- $\alpha$  as a crucial signaling  
48 component. Overall, the increment in the migration capacity of PTCs can be understood as  
49 a stromal reaction which facilitates the initial steps of TGCT invasion.  
50

## 51 **ACKNOWLEDGEMENTS**

52 Research grants from the Spanish Ministries of Education and Science (BFU 2007-66610)  
53 and Economy and Competitiveness (SAF2012-39773), the regional Basque Government  
54 Research Groups Program (T560-10) and the SAIOTEK Program (SOA11UN001) of the  
55 Basque Science, Technology & Innovation net (SPRI) to J. Aréchaga supported this work.  
56 Pablo Moreno-Ruiz had a fellowship from the Jesús Gangoiti Barrera Foundation (Bilbao,  
57 Spain). Finally, Dr. Juan Anguita, Ikerbasque Research Professor from the CIC bioGUNE  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

at The Bizkaia Technological Park, Spain, is gratefully acknowledged for his help with TNF- $\alpha$  ELISA experiment.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

PM-R, JArl, AD-T and US performed basic research activities, data analysis and interpretation and wrote the manuscript. RA, ZB, MS and MD-N collaborated in different aspects of laboratory research. JA are directed the research project.

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
**REFERENCES**

Ailenberg M, Tung PS, Pelletier M & Fritz IB. (1988) Modulation of Sertoli cell functions in the two-chamber assembly by peritubular cells and extracellular matrix. *Endocrinology* 122, 2604–2612.

Albrecht M, Ramsch R, Kohn FM, Schwarzer JU & Mayerhofer A. (2006) Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1956-1960.

Alonso A, Breuer B, Steuer B & Fischer J. (1991) The F9-EC cell line as a model for the analysis of differentiation. *Int J Dev Biol.* 35, 389-97.

Berstine EG, Hooper ML, Grandchamp S & Ephrussi B. (1973) Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci* 70, 3899-903.

Bonuccelli G, Avnet S, Grisendi G, Salerno M, Granchi D, Dominici M, Kusuzaki K & Baldini N. (2014) Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells. *Oncotarget* 5, 7575-7588.

Carstens JL, Shahi P, Van Tsang S, Smith B, Creighton CJ, Zhang Y, Seamans A, Seethammagari M, Vedula I, Levitt JM, Ittmann MM, Rowley DR & Spencer DM. (2014) FGFR1-WNT-TGF- $\beta$  signaling in prostate cancer mouse models recapitulates human reactive stroma. *Cancer Res* 74, 609-620.

Chia VM, Quraishi SM, Devesa SS, Purdue MP, Cook MB & McGlynn KA. (2010) International trends in the incidence of testicular cancer 1973-2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19, 1151-1159.

Chiarenza C, Filippini A, Tripiciano A, Beccari E & Palombi F. (2000) PDGF-BB stimulates hypertrophy of peritubular smooth muscle cells from rat testis in primary cultures. *Endocrinology* 141, 2971–2981.

Cooper DE, L'Esperance JO, Christman MS & Auge BK. (2008) Testis cancer: a 20-year epidemiological review of the experience at a regional military medical facility. *J Urol* 180, 577– 582.

Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF & Seidl K. (1990) Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 262, 253-261.

De Wever O, Lapeire L, De Boeck A & Hendrix A. (2010) Cellular and molecular mechanisms of cancer cell invasion. *Verh K Acad Geneesk Belg* 72, 309-326.

De Wever O, Van Bockstal M, Mareel M, Hendrix A & Bracke M. (2014) Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. *Semin Cancer Biol* 25, 33-46.

De Wever O, Demetter P, Mareel M & Bracke M. (2008) Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 123, 2229-2238.

Díez-Torre A, Silván U, De Wever O, Bruyneel E, Mareel M, Aréchaga J. (2004) Germinal tumor invasion and the role of the testicular stroma. *Int J Dev Biol* 48: 545-557

1  
2  
3 Díez-Torre A, Silván U, Moreno P, Gumucio J & Aréchaga J. (2011) Peritubular myoid cell  
4 derived factors and its potential role in the progression of testicular germ cell tumours. *Int J*  
5 *Androl* 34, e252-265.

6  
7 Flenkenthaler F, Windschüttl S, Fröhlich T, Schwarzer JU, Mayerhofer A & Arnold GJ.  
8 (2014) Secretome analysis of testicular peritubular cells: a window into the human  
9 testicular microenvironment and the spermatogonial stem cell niche in man. *J Proteome*  
10 *Res* 13, 1259-1269.

11  
12 Gnessi L, Emidi A, Scarpa S, Palleschi S, Ragano-Caracciolo M, Silvestroni L, Modesti A  
13 & Spera G. (1993) PDGF effects on purified testicular peritubular myoid cells: binding,  
14 cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase, mitogenic activity and extracellular matrix production  
15 enhancement. *Endocrinology* 133: 1880–1890.

16  
17  
18 Gialeli C, Theocharis AD & Karamanos NK. (2011) Roles of matrix metalloproteinases in  
19 cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 278, 16–27.

20  
21 Hagedorn HG, Bachmeier BE & Nerlich AG. (2001) Synthesis and degradation of  
22 basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF beta in  
23 invasive carcinomas (Review). *Int J Oncol* 18, 669-681.

24  
25  
26 Johansson N, Ahonen M & Kähäri VM. (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion.  
27 *Cell Mol Life Sci* 57, 5-15.

28  
29 Kawamoto M, Matsunami T, Ertl RF, Fukuda Y, Ogawa M, Spurzem JR, Yamanaka N  
30 & Rennard SI. (1997) Selective migration of alpha-smooth muscle actin-  
31 positive myofibroblasts toward fibronectin in the Boyden's blindwell chamber. *Clin Sci* 93,  
32 355-362.

33  
34  
35 Mayerhofer A. (2013) Human testicular peritubular cells: more than meets the eye.  
36 *Reproduction* 145, 107-116.

37  
38 Milia-Argeiti E, Huet E, Labropoulou VT, Mourah S, Fenichel P, Karamanos NK, Menashi  
39 S & Theocharis AD. (2012) Imbalance of MMP-2 and MMP-9 expression versus TIMP-  
40 1 and TIMP-2 reflects increased invasiveness of human testicular germ cell tumours. *Int J*  
41 *Androl* 35,835-844.

42  
43  
44 Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y & Sameshima T. (2002) Matrix metalloproteinases in  
45 tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 52, 255-264.

46  
47 Nuti E, Tuccinardi T & Rossello A. (2007) Matrix metalloproteinase inhibitors: new  
48 challenges in the era of post broad-spectrum inhibitors. *Curr Pharm Design* 13, 2087–  
49 2100.

50  
51  
52 Oosterhuis JW & Looijenga LH. (2005) Testicular germ-cell tumours in a broader  
53 perspective. *Nat Rev Cancer* 5, 210-222.

54  
55 Palombi E Farini D, De Cesaris P & Stefanini M. (1988) Characterization of peritubular  
56 myoid cells in highly enriched in vitro cultures. In: Cooke BA, Sharpe RM (eds.), *Molecular*  
57 *and Cellular Endocrinology of the Testis*. New York: Raven Press 50, 311-317.



1  
2 Sesterhenn IA & Davis CJ Jr. (2004) Pathology of germ cell tumors of the testis. *Cancer*  
3 *Control* 11(6), 374-87.

4  
5 Schell C, Albrecht M, Mayer C, Ullrich Schwarzer J, Frungieri MB & Mayerhofer A. (2008)  
6 Exploring Human Testicular Peritubular Cells: Identification of Secretory Products and  
7 Regulation by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Endocrinology* 149, 1678–1686

8  
9 Silván U, Díez-Torre A, Andrade R, Arluzea J, Silio M & Arechaga J. (2011a) Embryonic  
10 stem cell transplantation into the seminiferous tubules. A model for the study of invasive  
11 germ cell tumors of the testis. *Cell Transplant* 20, 637-642.

12  
13 Silván U, Díez-Torre A, Jiménez Rojo L & Aréchaga J. (2011b) Embryonic and Cancer  
14 Stem Cells- two views of the same landscape. In: Embryonic Stem Cells: Recent  
15 Advances in Pluripotent Stem Cell-Based Regenerative Medicine (ed Craig S. Atwood),  
16 pp. 371-378 Intech, Croatia.

17  
18 Silván U, Díez-Torre A, Jimenez-Rojo L & Arechaga J. (2010) Vascularization of testicular  
19 germ cell tumours: evidence from experimental teratocarcinomas. *Int J Androl* 33, 765-  
20 774.

21  
22 Stuelten CH, Busch JI, Tang B, Flanders KC, Oshima A, Sutton E, Karpova TS, Roberts  
23 AB, Wakefield LM & Niederhuber JE. (2010) Transient tumor-fibroblast interactions  
24 increase tumor cell malignancy by a TGF-Beta mediated mechanism in a mouse xenograft  
25 model of breast cancer. *PLoS One* 5, e9832.

26  
27 Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG & Roberts  
28 AB. (2005) Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion  
29 of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci* 118, 2143-2153.

30  
31 Suominen JS, Wang Y, Kaipia A & Toppari J. (2004) Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )  
32 promotes cell survival during spermatogenesis, and this effect can be blocked by  
33 infliximab, a TNF- $\alpha$  antagonist. *Eur J Endocrinol* 151:629–640

34  
35 Toppari J. (2013) Carcinoma *in situ* – from clinical observation to a paradigm shift for  
36 testicular carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 57, 221-223

37  
38 Verhoeven G & Cailleau J. (1988) Testicular Peritubular Cells Secrete a Protein under  
39 Androgen Control that Inhibits Induction of Aromatase Activity in Sertoli Cells  
40 *Endocrinology* 123, 2100-2110.

41  
42 Yan W, Zhang W, Sun L, Liu Y, You G, Wang Y *et al.*, (2011) Identification of MMP-9  
43 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in  
44 glioblastoma multiforme. *Brain Res* 1411, 108–115.

45  
46 Yang WL, Godwin AK, & Xu XX. (2004) Tumor necrosis factor alpha- induced matrix  
47 proteolytic enzyme production and basement membrane remodeling by human ovarian  
48 surface epithelial cells: molecular basis linking ovulation and cancer risk. *Cancer Res* 64,  
49 1534-1540.

## Tables

**Table 1 Sequence of the primers used for PCR analysis Gene Primer Sequence**

Gene	Primer	Sequence
RPL13	Forward	CCGAAGAAGGGAGACAGTTCTGCTG
	Reverse	CGGAGACTGGCAAAGCCTTAAAGT
MMP-2	Forward	AACTACGATGATGACCGAAGTG
	Reverse	TGGCATGGCCGAACTCA
MMP-9	Forward	CGAACTTCGACACTGACAAGAAGT
	Reverse	GCACGCTGGAATGATCTAAGC

## Figure Legends

**Figure 1. MMP-2 and MMP-9 expression and secretion by PTCs.** RT-PCR and RT-qPCR of MMP-9 mRNA expression in PTCs in response to F9 conditioned medium is increased significantly. \*  $p < 0.05$  in comparison with the response to control medium (A,B). MMP-9 and MMP-2 gelatin zymography using PTC and F9 control cultures (Lanes 1,2), PTCs treated with F9-conditioned medium (Lane 3) and PTCs co-cultured with F9 EC cells (Lane 4) (C-D).

**Figure 2.  $\alpha$ -SMA and MMP-9 immunofluorescence in peritubular myoid cell cultures.** Regulatory effects of Embryonal Carcinoma cells and TNF- $\alpha$  on MMP-9 expression were also found using immunocytochemistry. MMP-9 was practically undetectable in control cells (A). In contrast, F9-CM (B) and TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) (D) stimulated PTCs to express MMP-9 protein; co-culture with F9 cells stimulated vast expression of MMP-9 in PTCs (C). The assay was performed with antibodies against smooth muscle  $\alpha$ -actin (red, PE), against MMP-9 (green, FITC) and DAPI (blue) for DNA as counter staining. Scale bars, 50  $\mu$ m.

**Figure 3. Effect of EC-conditioned medium and TNF- $\alpha$  on PTC migration.** (A) Representative images of EC-CM treatment at 0 and 24 hours (left) and percentage of uncovered substrate (right). (B) PTC cell cycle profiles showed no variation in control cultures (left) and in PTCs treated with EC-conditioned media (right). (C) Representative micrographs of the cultures incubated with TNF- $\alpha$  taken at 0 and 24 hours (left) and wound percentage (right).

**Figure 4. TNF- $\alpha$  causes MMP secretion and expression.** (A) Mouse TNF- $\alpha$ -ELISA was used to quantify TNF- $\alpha$  secreted by control PTCs, PTCs treated with F9-conditioned media, co-cultures of PTC-F9 cells, F9 cells and F9 treated with PTC-conditioned media. (B) Relative expression of MMP-2 and MMP-9 gelatinase mRNAs by PTCs treated with TNF- $\alpha$ . (C) Gelatin zymography from PTCs incubated with TNF- $\alpha$ .

**Figure 5. Immunolocalization of TNF- $\alpha$  in peritubular myoid cell and EC cell cultures.** TNF- $\alpha$  sources were detected by immunocytochemistry in mono- and co-cultures of PTC and F9 cells. TNF- $\alpha$  was absent in PTC cultures and F9 cultures (A,B). In contrast, it was highly expressed in co-cultures of both cells in which its expression was mainly confined to F9 cells that were surrounded by PTCs (C). Staining of smooth muscle  $\alpha$ -actin (green,

1  
2 FITC), TNF- $\alpha$  (red, Alexa Fluor 555) and DNA (DAPI) is shown. Scale bars represent 50  
3  $\mu\text{m}$ .  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

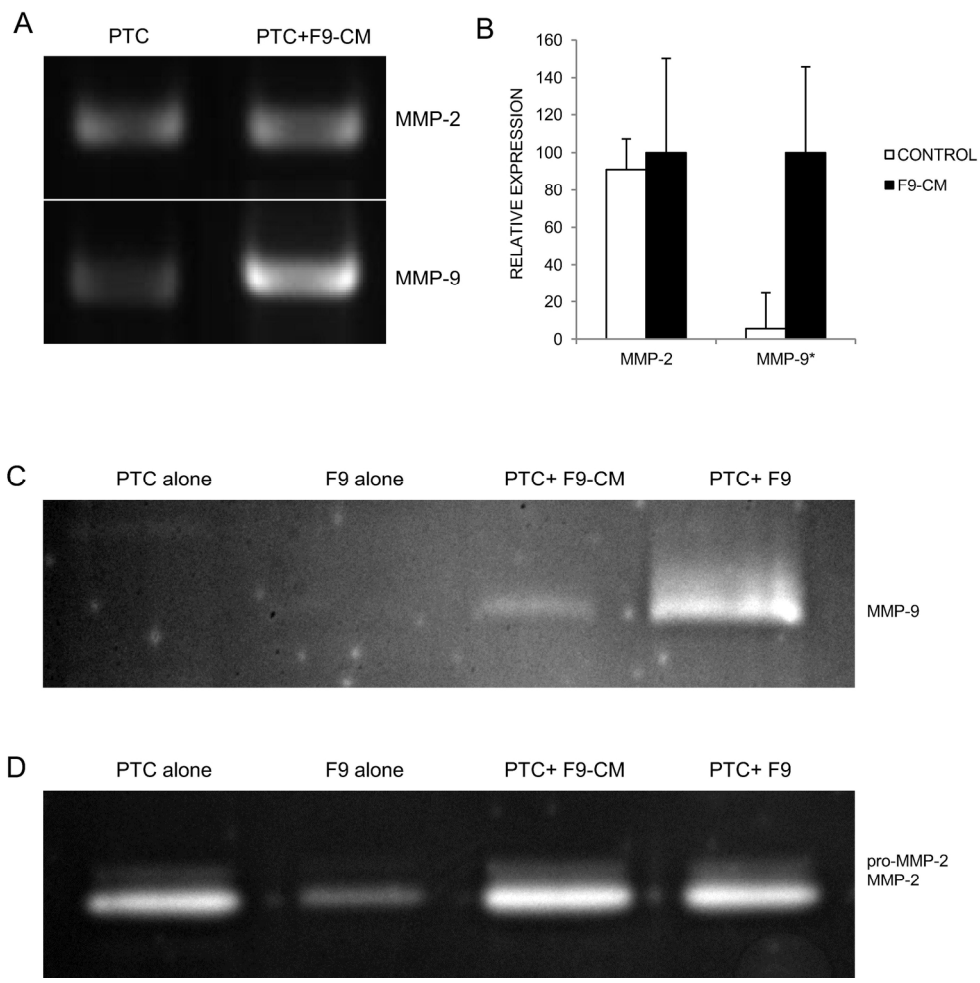


Figure 1. MMP-2 and MMP-9 expression and secretion by PTCs. RT-PCR and RT-qPCR of MMP-9 mRNA expression in PTCs in response to F9 conditioned medium is increased significantly. \*  $p < 0.05$  in comparison with the response to control medium (A,B). MMP-9 and MMP-2 gelatin zymography using PTC and F9 control cultures (Lanes 1,2), PTCs treated with F9-conditioned medium (Lane 3) and PTCs co-cultured with F9 EC cells (Lane 4) (C-D).  
170x168mm (300 x 300 DPI)

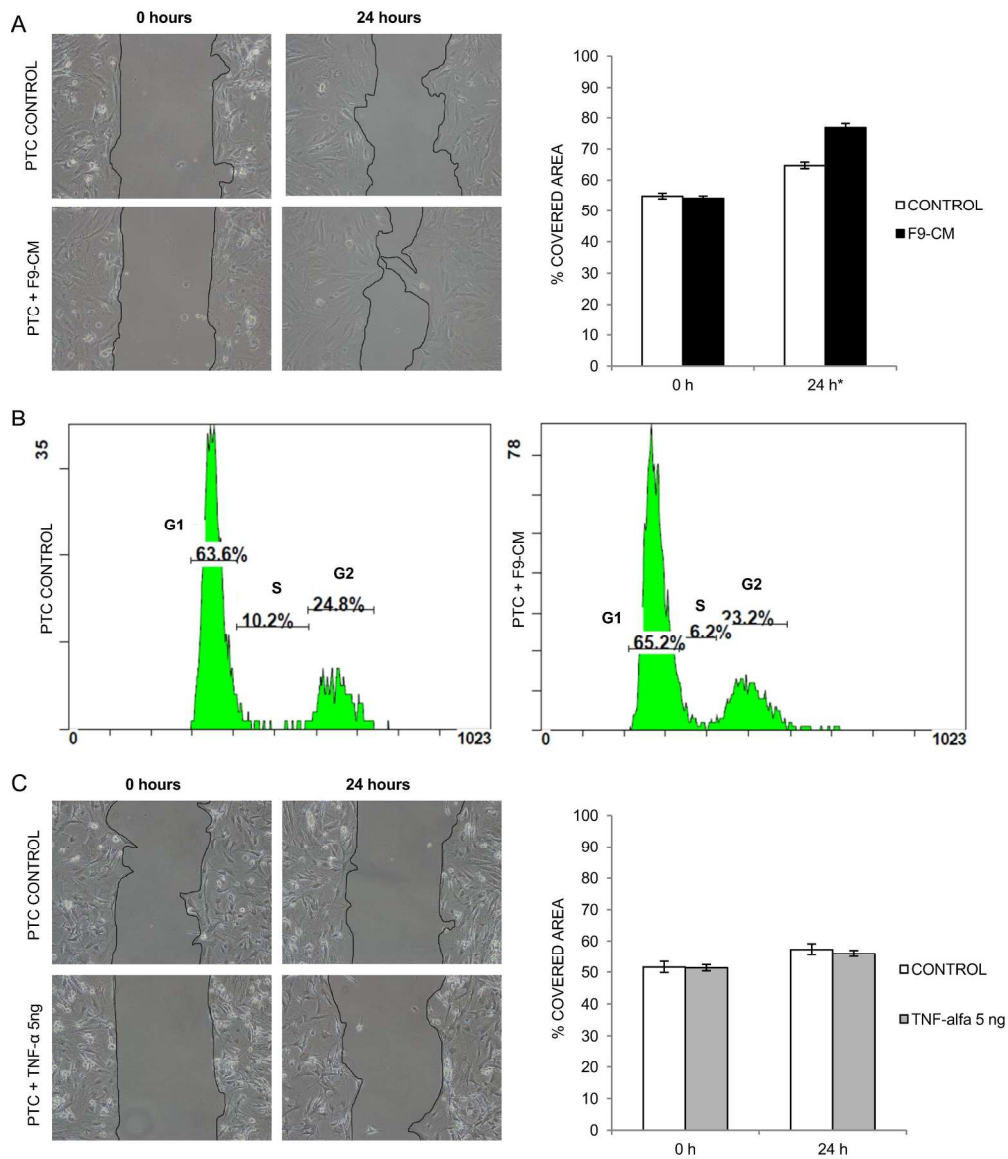


Figure 2.  $\alpha$ -SMA and MMP-9 immunofluorescence in peritubular myoid cell cultures. Regulatory effects of Embryonal Carcinoma cells and TNF- $\alpha$  on MMP-9 expression were also found using immunocytochemistry. MMP-9 was practically undetectable in control cells (A). In contrast, F9-CM (B) and TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) (D) stimulated PTCs to express MMP-9 protein; co-culture with F9 cells stimulated vast expression of MMP-9 in PTCs (C). The assay was performed with antibodies against smooth muscle  $\alpha$ -actin (red, PE), against MMP-9 (green, FITC) and DAPI (blue) for DNA as counter staining. Scale bars, 50  $\mu$ m. 213x250mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

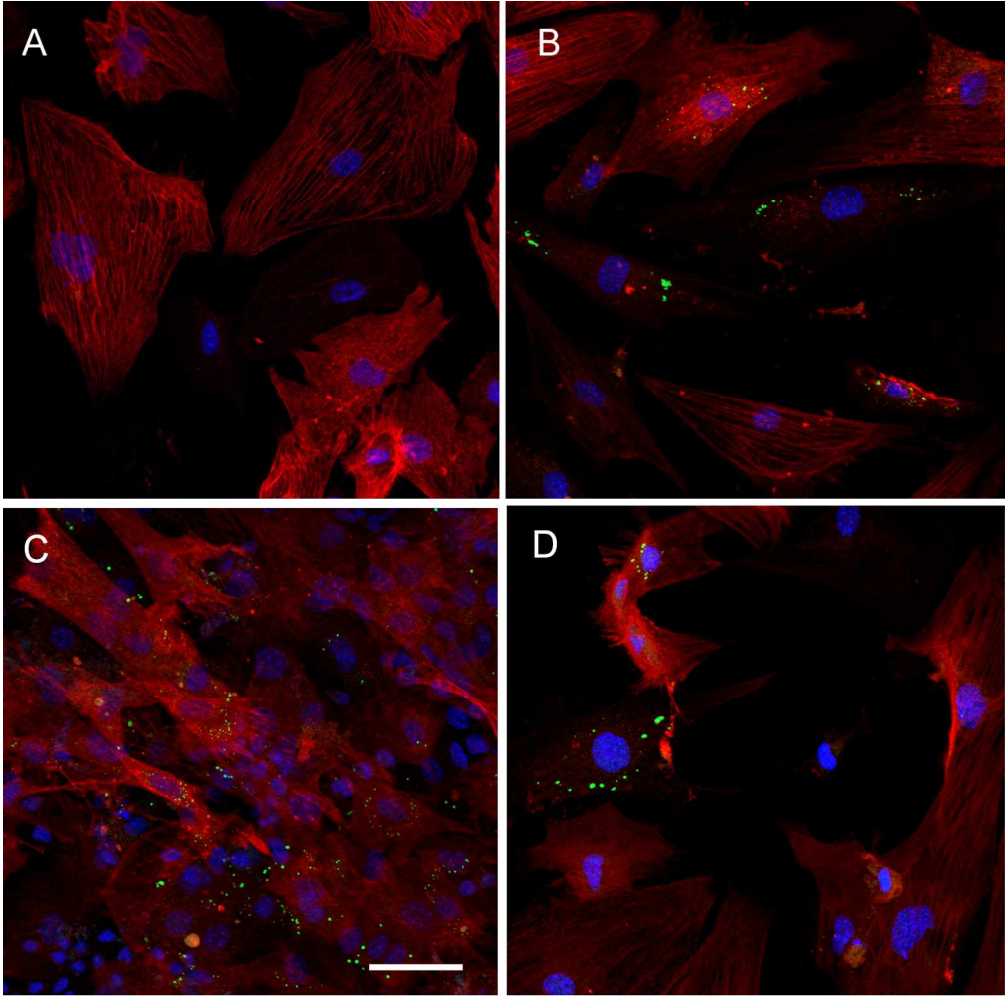


Figure 3. Effect of EC-conditioned medium and TNF- $\alpha$  on PTC migration. (A) Representative images of EC-CM treatment at 0 and 24 hours (left) and percentage of uncovered substrate (right). (B) PTC cell cycle profiles showed no variation in control cultures (left) and in PTCs treated with EC-conditioned media (right). (C) Representative micrographs of the cultures incubated with TNF- $\alpha$  taken at 0 and 24 hours (left) and wound percentage (right).  
178x177mm (300 x 300 DPI)

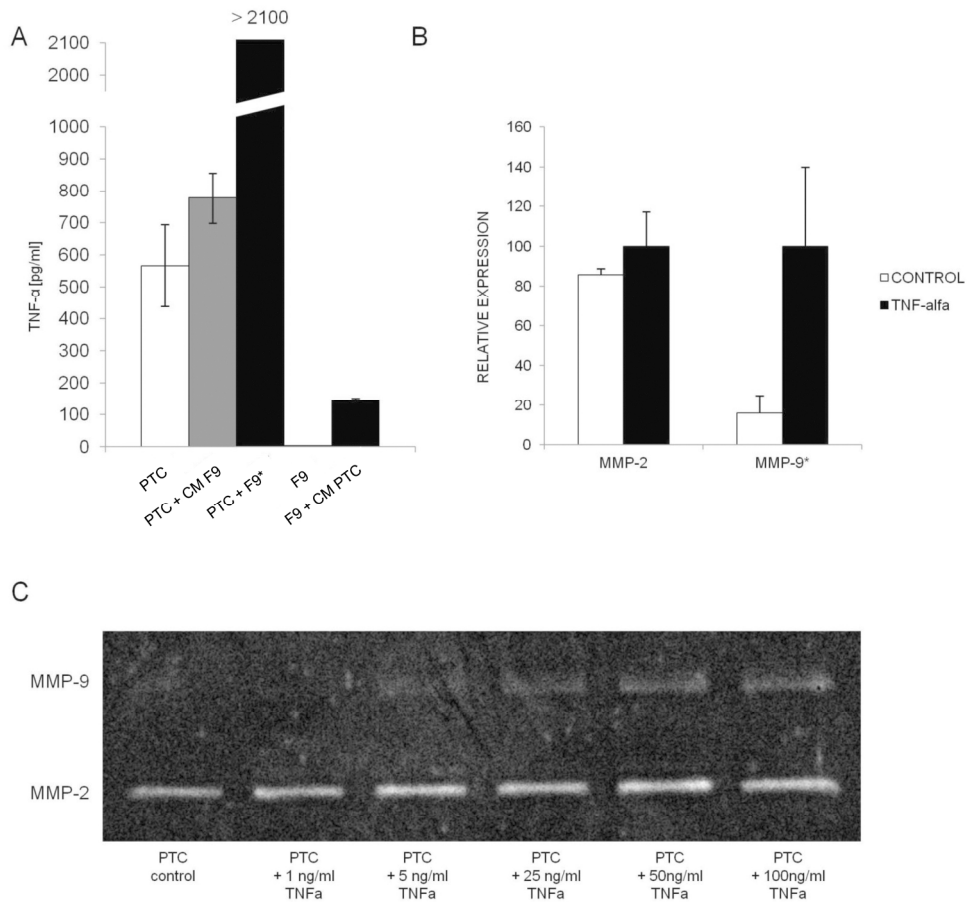


Figure 4. TNF-α causes MMP secretion and expression. (A) Mouse TNF-α ELISA was used to quantify TNF-α secreted by control PTCs , PTCs treated with F9-conditioned media, co-cultures of PTC-F9 cells, F9 cells and F9 treated with PTC-conditioned media. (B) Relative expression of MMP-2 and MMP-9 gelatinase mRNAs by PTCs treated with TNF-α. (C) Gelatin zymography from PTCs incubated with TNF-α. 190x177mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

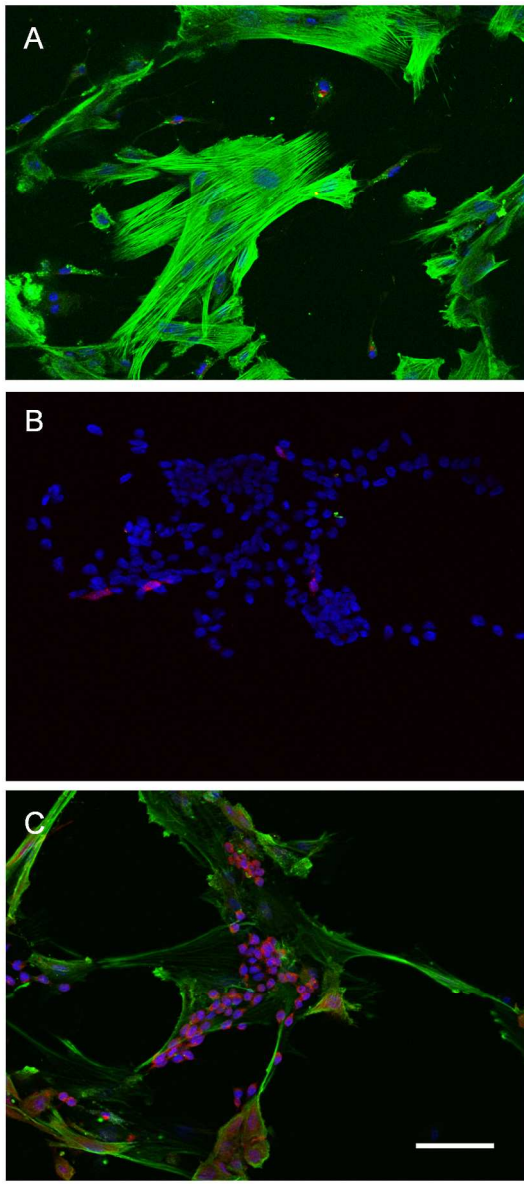


Figure 5. Immunolocalization of TNF- $\alpha$  in peritubular myoid cell and EC cell cultures. TNF- $\alpha$  sources were detected by immunocytochemistry in mono- and co-cultures of PTC and F9 cells. TNF- $\alpha$  was absent in PTC cultures and F9 cultures (A,B). In contrast, it was highly expressed in co-cultures of both cells in which its expression was mainly confined to F9 cells that were surrounded by PTCs (C). Staining of smooth muscle  $\alpha$ -actin (green, FITC), TNF- $\alpha$  (red, Alexa Fluor 555) and DNA (DAPI) is shown. Scale bars represent 50  $\mu$ m. 108x243mm (300 x 300 DPI)





Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

## Department of Cell Biology and Histology

Laboratory of Stem Cells, Development and Cancer

Tel.: (34) 946 012 883 / (34) 946 012 874 / (34) 946 012 881 Fax: (34) 946 013 266

e-mail: [juan.arechaga@ehu.es](mailto:juan.arechaga@ehu.es) web: <http://www.intjdevbiol.com>

Dr. Ewa Rajpert-De Meyts  
Editor-in-Chief of *Andrology*

23/06/2015

Dear Editor/ Dear Ewa:

Please find enclosed our manuscript entitled “**Testis peritubular myoid cells (PTCs) increase their motility and express MMP-9 after interaction with embryonal carcinoma cells**” which we hope you will consider for publication in your prestigious journal.

We have studied the *in vitro* interactions between murine embryonal carcinoma (EC) cells and seminiferous peritubular myoid cells (PTCs), as a part of the primary invasive process of testicular germ cell tumors (TGCTs). In our experiments with primary cultures of murine PTCs and F9 embryonal carcinoma (EC) cells, we have identified the induction of MMPs secretion and migration of PTCs after interactions with EC cells. From a variety of factors and molecules implicated in tumor-stroma relationships, we focused our interest on the influence of TNF- $\alpha$ , a cytokine that induced MMP-9 expression, but does not increase migration capacity in PTCs. These results indicate that PTCs might play a role during early stages of TGCTs progression.

I also include a journal cover suggestion, with its corresponding cover caption.

As possible experts in the matter, I would like to suggest the followings:

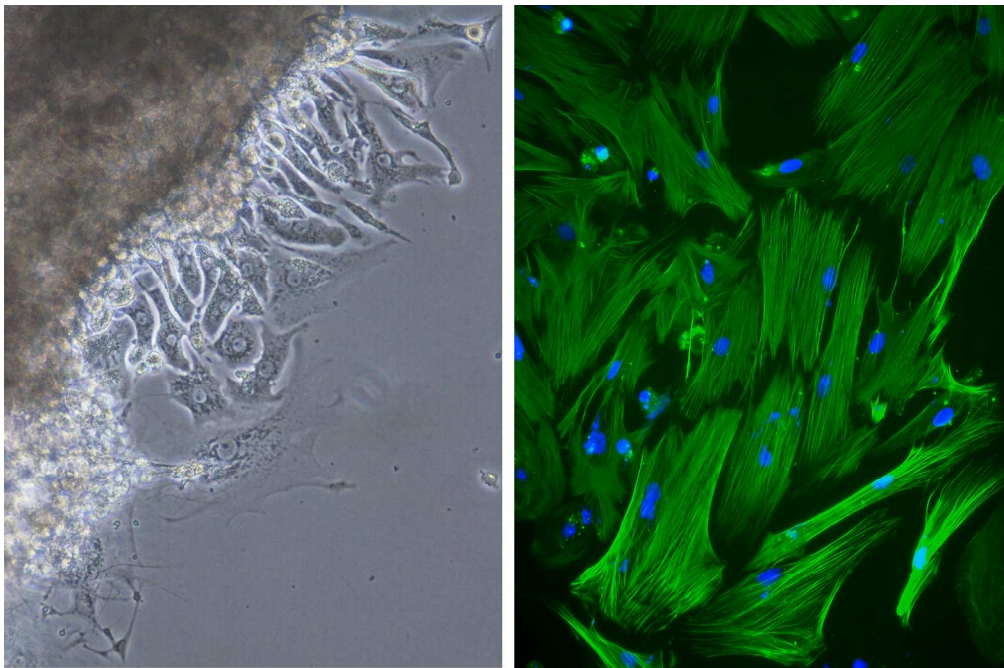
- Prof.Dr. Artur Mayerhofer ([mayerhofer@lrz.uni-muenchen.de](mailto:mayerhofer@lrz.uni-muenchen.de))
- Prof.Dr. Ivan Damjanov ([idamjano@kumc.edu](mailto:idamjano@kumc.edu))
- Prof.Dr. Angel Alonso ([a.alonso@Dkfz-Heidelberg.de](mailto:a.alonso@Dkfz-Heidelberg.de))
- Dr. Olivier De Wever ([olivier.dewever@ugent.be](mailto:olivier.dewever@ugent.be))
- Prof.Dr. Peter Andrews ([P.W.Andrews@sheffield.ac.uk](mailto:P.W.Andrews@sheffield.ac.uk))

The manuscript has been seen and approved by all the authors.

Sincerely yours,

Juan Arechaga, MD-PhD  
Professor of Cell Biology

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Peritubular myoid cells (PTCs) growing from the periphery of an explant of murine seminiferous tubule (left) and positivity to alpha-smooth muscle actin in a primary culture of this kind of cells (cell nuclei stained in blue by DAPI).

168x111mm (300 x 300 DPI)

Review

## COVER CAPTION

Peritubular myoid cells (PTCs) growing from the periphery of an explant of murine seminiferous tubule (left) and positivity to alpha-smooth muscle actin in a primary culture of this kind of cells (cell nuclei stained in blue by DAPI).

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## REVIEW ARTICLE

# Peritubular myoid cell-derived factors and its potential role in the progression of testicular germ cell tumours

A. Díez-Torre, U. Silván<sup>1</sup>, P. Moreno, J. Gumucio and J. Aréchaga

Laboratory of Stem Cells, Development &amp; Cancer, Department of Cell Biology &amp; Histology, Faculty of Medicine &amp; Dentistry and Analytical &amp; High Resolution Biomedical Microscopy Core Facility, University of the Basque Country, Leioa, Vizcaya, Spain

**Keywords:**

cancer, carcinoma in situ testis, testicular neoplasms

**Correspondence:**

Juan Aréchaga, Laboratory of Stem Cell, Development & Cancer, Department of Cell Biology & Histology, Faculty of Medicine & Dentistry and Analytical & High Resolution Biomedical Microscopy Core Facility, University of the Basque Country, E-48940 Leioa, Vizcaya, Spain.  
E-mail: juan.arechaga@ehu.es

**<sup>1</sup>Present address:**

Maurice E. Muller Institute for Structural Biology, Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland.

Received 1 December 2010; revised 24 February 2011; accepted 7 March 2011

doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01168.x

**Summary**

The tumour surrounding stroma, known as reactive stroma, is a crucial factor to understand cancer cell growth and invasion. In the normal adult testis, the stroma contains extracellular matrix components, fibroblasts, infiltrating leucocytes, lymphocytes, macrophages and capillaries, as well as other specific cell populations, like Leydig cells and a thin myoepithelium surrounding the seminiferous tubules constituted by the peritubular cells. All these cells are an important source of proliferation and survival promoting signals, proteolytic enzymes, migratory cues and pro-angiogenic factors. Ascribable to this pro-invasive activity, the tumour reactive stroma cells, especially cancer-associated myofibroblasts, have emerged as a promising target for cancer therapy. This review is focused on the potential role of the peritubular myoid cells in the development of testicular germ cell tumours as the precursors of cancer-associated myofibroblast and on an experimental model for the study of testis germinal cancer stroma and on the differences between normal and tumour-associated stromal cells, including the molecular mechanisms that mediate the important cancer stroma crosstalk. Special attention will be paid to the cancer-associated myofibroblasts as possible therapeutic targets, because they are one of the main components of the reactive stroma and are known to secrete a variety of paracrine factors that stimulate tumour progression.

**Introduction**

Until a few years ago, the scientific research on cancer biology had been focused primarily in the study of the malignant cells themselves; however, a number of recent observations have driven the attention towards the non-malignant part of the tumour, the tumour stroma, as a crucial factor in the regulation of tumour growth and cancer progression and, consequently, as a promising new therapeutic target (Gonda *et al.*, 2010). Tumour stroma is constituted by the extracellular matrix and a number of cell types that vary among different tissues but that usually include fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells and resident or infiltrating cells of the immune system, such as macrophages and mastocytes. Within neoplastic regions, a crosstalk takes place between cancer cells and stroma cells that leads to important changes in the tumour microenvironment. When stroma cells are

stimulated by cancer cell-derived factors they change their morphological and biochemical features, including the expression and secretion of growth factors, proteolytic enzymes and other mediators that are involved in processes such as angiogenesis, tumour growth, survival, invasion and metastasis (Zigrino *et al.*, 2005; De Wever *et al.*, 2008). Among the components of the so-called tumour reactive stroma a special attention has been paid to the fibroblastic cells usually found at the tumour invasion front (Desmoulière *et al.*, 2004; De Wever *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2010). These fibroblastic cells have been referred as peritumoural fibroblasts, reactive stroma, cancer-associated fibroblasts (CAF) and myofibroblasts. Generally, cancer cell-surrounding fibroblasts express  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), one of the main markers for differentiated myofibroblasts. Unfortunately, there is no myofibroblast-specific immunocytochemical marker, so the characterization of myofibroblasts requires a

complex board of positive and negative markers (De Wever *et al.*, 2008). Throughout the present review, the terms fibroblast or myofibroblast will be employed depending on the terminology used by the cited reference.

There are a number of recent studies that demonstrate the important role of these reactive stroma cells in the progression of different tumour types, including breast (Orimo *et al.*, 2005), colon (De Wever *et al.*, 2004), prostate (Condon & Bosland, 1999) or squamous cell carcinomas (Kramer *et al.*, 1986). Nevertheless, so far there are no studies on the role of tumour reactive stroma in the development and progression of testicular germ cell tumours.

Testicular germ cell tumours (TGCTs) constitute about 95% of all testicular neoplasias and are the most frequent cancer type affecting adolescents and young adults in Europe and North America (Chia *et al.*, 2010). Most of these tumours show an excellent response to cis-platinum-based chemotherapy and their survival index is higher than 90%. Nevertheless, their incidence rate has undergone an important increase in the last decades (Walscherts *et al.*, 2008; Townsend *et al.*, 2010) and there are a number of chemotherapy-resistant TGCTs that still cause the death of young patients. Carcinoma in situ of the testis (CIS) is the common precursor of the most frequent male germ cell derived tumours, a group that is classified as Type II TGCTs and that is constituted by seminomas and non-seminomas (Oosterhuis & Looijenga, 2005). CIS cells are considered to derive from early germ cells that have undergone a differentiation arrest, given that they share many morphological and immunohistochemical features with primordial germ cells (PGCs) and foetal gonocytes (Rajpert-De Meyts, 2006). Moreover, the stem cells of teratocarcinoma, the so-called embryonal carcinoma (EC) cells, are a pluripotent cell population with an expression profile of pluripotency markers, such as NANOG and OCT4, that resemble that of inner cell mass-derived embryonic stem (ES) cells (Andrews *et al.*, 2005).

There are many risk factors known to be related with TGCT development, like cryptorchidism, disorders of sex development and familiar predisposition (Richiardi *et al.*, 2007; Greene *et al.*, 2010); however, little is known about the role of the TGCT microenvironment in the original transformation of PGCs into CIS cells and the progression from intratubular lesions to invasive germ cell tumours. There are a number of evidences that point to microenvironmental changes in the differentiating gonads as an important factor involved in the development of germ cell neoplasias and some others disorders of sex development (Kristensen *et al.*, 2008). Concerning this, it has been reported that tumour microenvironment is directly involved in the maintenance of seminoma cell survival through the suppression of pro-apoptotic signals

(Olie *et al.*, 1996). Another microenvironmental factor that has been analysed in TGCTs is the interaction between tumour cells and ECM proteins, primarily mediated by integrins, which are known to play an important role in tumour progression. Significant changes in the integrin expression pattern and in the ECM composition and distribution between intratubular and invasive germ cell tumours have been reported, suggesting the implication of the stroma cell-mediated ECM remodelling in the acquisition of the malignant phenotype by TGCTs (Timmer *et al.*, 1994). Interestingly, it has been shown that stromal cells surrounding metastatic teratomas in lymph node specimens usually present the same genetic alterations as the metastatic teratoma cells. This result suggests that metastatic tumour-associated stroma is derived, at least partially, from the same progenitor as the metastatic teratoma itself (Brandli *et al.*, 2003). Despite these preliminary observations, the role of tumour-stroma interaction in germ cell tumour carcinogenesis has not been sufficiently explored.

The seminiferous tubules are constituted by a central lumen surrounded by the specialized seminiferous epithelium, formed by two different cell types: the Sertoli cells and the spermatogenic cells (spermatogonias, spermatocytes and spermatids). The seminiferous epithelium is enclosed by a basal membrane and an outer wall formed by collagen fibres, fibroblasts and peritubular cells. The interstitial space among the seminiferous tubules is occupied by blood vessels and lymphatic sinusoids together with androgen secreting Leydig cell aggregates. Interestingly, the peritubular cells, which are responsible of the contractile activity that drive the immotile spermatozoa towards the rete testis, are myofibroblasts-like cell that share immunohistochemical features of both fibroblasts and smooth muscle cells (Davidoff *et al.*, 1990). Recent studies on peritubular cells have demonstrated that their function is not only limited to contractility but they also play an important role in male gonad development and in the maintenance of spermatogenesis (Schell *et al.*, 2008). Moreover, their physical proximity to CIS cells, their phenotypical resemblance to myofibroblasts and its recently described function as regulators of testicular homeostasis suggest that these cells could play a critical role in the early stages of TGCT development as part of the tumour reactive stroma in response to CIS-derived signal (Díez-Torre *et al.*, 2004).

This review is focused on the role of cancer-associated myofibroblasts as a source of proinvasive factors; a special attention is given to the potential involvement of testis peritubular myoid cells as part of the TGCT reactive stroma. With this aim, we have summarized the current knowledge on the nature and function of peritubular myoid cells in normal testis, including several PTC-derived

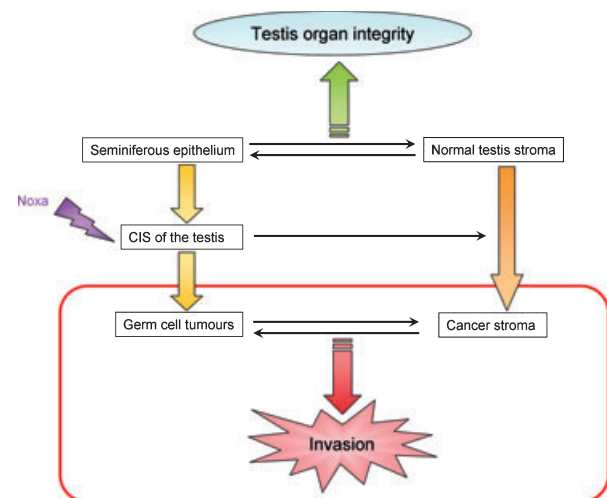
factors that might be involved in the transition from intratubular CIS to invasive and metastatic TGCTs. Finally, we propose a model of experimental teratocarcinomas obtained through ES cell transplantation into mouse seminiferous tubules as a useful tool for the study of TGCT reactive stroma.

### Role of the reactive stroma in tumour progression

The stroma is a key component of tissues and plays an indispensable role in the maintenance of epithelial homeostasis. The mutual interaction between epithelial and stromal cells has a great importance during cancer progression as several factors secreted by cancer cells lead to changes in the surrounding stroma so as to create a growth and invasion supporting microenvironment (De Wever *et al.*, 2008) (Fig. 1). The ability to invade and metastasize is hallmark of malignant cells and is one of the main causes of anticancer therapy resistance. There are a number of morphological evidences that demonstrate the implication of the host stroma in the acquisition of a malignant phenotype by the cancer cells; these are the accumulation of fibroblast-like cells and ECM proteins (desmoplasia) (Ohtani, 1999), the recruitment of lymphocytes, macrophages and other cells of the immune system (inflammation) (Ardies, 2003), and the formation of new blood and lymph vessels (angiogenesis) (Silván *et al.*, 2010b).

It has been repeatedly proven by clinical and experimental observations that the ability to invade and metastasize certain types of cancers depends on the localization of the primary tumour and, thus, of microenvironmental factors. Squamous cell carcinomas of the head and neck region constitute a good example of this phenomenon, because nasopharynx cancers metastasize into distant organs in about 40% of the cases, whereas the incidence of metastasis in those tumours originated in the glottis is just around 5% (Kramer *et al.*, 1986). In a similar way, it has been shown by some experimental tumour models that the site where the cancer cells are injected in the host animal is crucial for the formation of metastasis (Mareel *et al.*, 1991). Mammary carcinoma cells, for example, are able to metastasize when injected into the mammary fat pad but fail to do so when injected subcutaneously (Elliott *et al.*, 1988).

The interaction between carcinoma and stroma cells may be mediated through soluble factors, such as secreted growth factors, cytokines or proteolytic enzymes, through ECM proteins and through direct cell-cell contacts. It has been reported that carcinoma cells acquire a malignant phenotype when transplanted into wounded tissues (Dingemans *et al.*, 1993), suggesting that wound-healing mediators, such as TGF- $\beta$  and PDGF, could also be



**Figure 1** The reactive stroma in testis germinal tumours: The interactions between normal epithelium and normal stromal cells maintain the integrity of the epithelial tissue. The differentiation arrest of primordial germ cells during embryonic development can lead to the presence of CIS cells (Carcinoma in situ of the testis) in the seminiferous tubules; when CIS cells proliferation is stimulated by physical or chemical pathogenic agents (noxa), there are some changes in the cancer cell-derived signalling that lead to changes in the stroma. The new crosstalk between the cancer cells and the reactive stroma creates an altered microenvironment that facilitates invasion and metastasis (Modified from De Wever & Mareel, 2003).

involved in the alteration of tumour surrounding stroma (Barrientos *et al.*, 2008; De Wever *et al.*, 2008). Indeed, the presence of myofibroblast obtained through the activation of fibroblast is a common feature of both wound-healing and tumour reactive stroma. TGF- $\beta$  fulfils the requisites to be considered the main responsible of myofibroblast transdifferentiation; this molecule is known to be expressed by many carcinoma cells (Liu *et al.*, 2007; Mourskaia *et al.*, 2009), it has a strong chemoattractant effect on fibroblasts (Postlethwaite *et al.*, 1987) and, what is more important, it directly induces the transition from fibroblasts to myofibroblasts (Rønnov-Jessen & Petersen, 1993). On the other hand, PDGF does not have the ability to directly induce the fibroblast to myofibroblast transition; nevertheless, it stimulates fibroblasts and myofibroblast proliferation and indirectly attracts more myofibroblast to the invasion front through the induction of TGF- $\beta$  expression (Rønnov-Jessen & Petersen, 1993).

The proinvasive activity of human myofibroblasts has been proven in vitro using human colon cancer-derived myofibroblasts and human colon cancer cell lines (De Wever *et al.*, 2004). In these experiments, colon cancer cells showed invasion ability only in the presence of myofibroblast or myofibroblast-conditioned medium, pointing to soluble factors as mediators of the proinvasive activity.

A similar effect was observed in a coimplantation tumour xenograft model; human breast carcinoma-associated myofibroblasts promoted the growth of breast carcinoma cells significantly more than counterpart mammary fibroblasts derived from non-cancerous breast regions of the same patients or normal fibroblasts obtained from a reduction mammoplasty (Orimo *et al.*, 2005). In this model, myofibroblast-secreted SDF-1 was identified as the main mediator of cancer progression through the induction of tumour growth and angiogenesis. Additional mediators of the complex interaction between the carcinoma and stroma cells within the tumour microenvironment have been identified through the study of transgenic mouse models. BMP signalling has been reported to be one of these mediators as the inactivation of Type II BMP receptor in the intestinal stroma cells leads to an expansion of the myofibroblast population and to colorectal epithelial overgrowth (Beppu *et al.*, 2008). On the other hand, hepatocyte growth factor (HGF) has been suggested to be the mediator of epithelial and stromal cell proliferation observed in transgenic mice with a selective suppression of the TGF- $\beta$  signalling in fibroblast (Bhowmick *et al.*, 2004). Other mesenchymal factors that have been claimed to participate in the epithelium-stroma crosstalk are the forkhead transcription factors; inactivation of these proteins in a transgenic mouse model led to a reduction of *Bmp4* expression and an up-regulation of *Wnt5a* in mesenchymal cells. The subsequent activation of the Wnt pathway promotes colon epithelial cell overgrowth and apoptosis resistance (Ormestad *et al.*, 2006). Detection of pre-labelled fibroblasts into ovarian carcinomas demonstrated that fibroblasts are extensively recruited towards the tumour surrounding stroma, where they acquire a myofibroblast phenotype and colocalize with angiogenic blood vessels in the outer edge of the tumour (Granot *et al.*, 2007). A recent study with cocultures of squamous cell carcinoma and carcinoma-associated fibroblast has shown that CAFs can remodel the extracellular matrix to generate paths that facilitate the invasion of cancer cells (Gaggioli *et al.*, 2007). In this process, integrin-mediated matrix attachment and actomyosin force generation enable cancer-associated fibroblasts to move matrix components such as collagen fibres. Rab family of small G proteins regulates this ECM remodelling because they mediate the integrin trafficking in the cells. Indeed, it has been reported that functional disruption of Rab proteins through HMG-CoA reductase inhibitors partially reduces the myofibroblast-mediated ECM remodelling and thus the carcinoma cell invasiveness (Hooper *et al.*, 2010).

The presence of genetic mutations is a frequent characteristic of cancer-associated fibroblasts and myofibroblasts, and it usually contributes to the acquisition of an

aggressive phenotype in both stroma and carcinoma cells. The abundance of these stroma cell mutations has been partially explained demonstrating that microenvironmental changes produced by carcinoma cells give place to selective pressures in the surrounding stroma. This is the case in a mouse model of prostate cancer where the inhibition of pRb function in carcinoma cells induces a paracrine p53 response that inhibits the proliferation of cancer-associated fibroblast. This interaction produces a strong selective pressure that leads to the selection of those fibroblasts that have undergone p53 loss (Hill *et al.*, 2005). Indeed, p53 mutations have been found in more than 25% of breast cancers and, more importantly, the detection of p53 mutations in tumour stroma cells significantly correlates with lymph node metastases (Patocs *et al.*, 2007). Several hypotheses have been suggested to explain the acquisition of genetic mutations by stroma cells, such as the increase of reactive oxygen species in the tumour microenvironment or the epithelial origin of mutated stromal cells through epithelial-to-mesenchymal transition, but the actual mechanism is still unknown (Brandli *et al.*, 2003; Radisky *et al.*, 2005; Mink *et al.*, 2010).

All in all, tumour stroma can be seen as a sort of specialized tissue that emerges from host cells and interacts with the cancer cells through different types of signals associated with cell growth, differentiation, survival and migration. Indeed, cancer cell-derived signals recruit and activate different type of stroma cells, mainly fibroblasts, myofibroblasts and cells of the immune system. The crosstalk between these cells and the neoplastic cells usually leads to the tumour progression and metastasis. In the testicular germ cell tumour microenvironment, peritubular myoid cells could play a significant role in the formation of the tumour reactive stroma as they fulfil many myofibroblast-specific features and secrete a number of proinvasive signals involved in the testicular function.

### Nature and function of peritubular myoid cells

As we have previously mentioned, the wall of the seminiferous tubules is constituted by the so-called peritubular cells (PTCs) (Holstein *et al.*, 1996), a group of elongated and very flat cells that are organized in several layers in human seminiferous tubules. PTCs present morphological features and specific markers of both fibroblasts and smooth muscle cells, such as CD90, CD34, myosin-heavy-chain, desmin, vimentin and smooth-muscle actin (Davidoff *et al.*, 1990; Albrecht *et al.*, 2006). PTCs are seen as structural cells with a contractile ability that is regulated by the direct action of angiotensin through specific receptors found in PTCs membranes (Rossi *et al.*, 2002). Therefore, it is usually considered that the main function

of these myoid cells is the propulsion of the testicular fluid containing immobile spermatozoa towards the rete testis (Romano *et al.*, 2005). Nevertheless, the research on PTCs has recently revealed additional features and functions of these myofibroblast-like cells that render PTCs with a more complex cell type than previously thought. Most of this research has been performed with rodent PTCs, because they are easier to obtain than pathologically unaltered human samples, even though rodent PTCs are usually arranged forming a single monolayer, and thus they are less abundant than in human testis.

Peritubular myoid cell cytoskeleton components include myosin, desmin/vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin and a great quantity of actin filaments that present a species-specific distribution. In the rat testis, the actin filaments within each PTC run both longitudinally and circularly to the long axis of the seminiferous tubule, conforming a latticework pattern. Alterations in the typical arrangement of the PTCs actin filaments have been observed in association with disrupted spermatogenesis, like in cases of cryptorchidism (Maekawa *et al.*, 1996).

The expression of androgen receptors is a common characteristic of Sertoli cells, Leydig cells, spermatids and PTCs (Anthony *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 2002). It has been recently demonstrated that androgen signalling in the last is necessarily involved in the maintenance of normal Sertoli cell function and PTCs contractility (Zhang *et al.*, 2006). This androgen-dependent interaction between PTCs and Sertoli cells has been suggested to be mediated by PModS, a molecule secreted by PTCs that modulates the secretion of transferrin, inhibin and androgen-binding protein by Sertoli cells (Verhoeven *et al.*, 2000), although other PTC-derived factors, such as IGF-I, bFGF and several cytokines, share most of the PModS effects on Sertoli cells, and thus could also participate in its functional regulation (Verhoeven *et al.*, 2000). Interestingly enough, alterations in transferrin and inhibin levels have been related with an increased invasiveness and poor prognosis in several tumour types (Mylonas *et al.*, 2005; Balanathan *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Habashy *et al.*, 2010). Moreover, the analysis of the rodent model has shown that PTCs are also involved in the regulation of processes such as spermatogenesis and testicular development (Mackay & Smith, 2007) through the secretion of factors that includes Fibroblast Growth Factors (El Ramy *et al.*, 2005), TGF- $\beta$  (Konrad *et al.*, 2000a) and ECM components (Ailenberg *et al.*, 1988). The include, primarily, components of the basement membrane such as fibronectin, collagens, proteoglycans and entactin. Indeed, one of the main functions of PTCs, in co-operation of Sertoli cells, is the secretion of the basement membrane that separates the seminiferous epithelium, including Sertoli cells, from the mesenchyme, where

PTCs are located. The basement membrane of the seminiferous tubules has a structural function that might be crucial for a proper tubule formation during testicular development (Konrad *et al.*, 2000b; Weber *et al.*, 2002). The basement membrane is also a physical barrier that prevents carcinoma cells to invade the mesenchyme, consequently, changes in the secretory activity of PTCs could lead to the loss of the basement membrane homeostasis and contribute to the progression from intratubular to invasive TGCTs; as it has been claimed in other neoplasias (Timmer *et al.*, 1994; Gaggioli *et al.*, 2007). Related to this subject, it has been reported that PDGF, that is present in normal testis and appears usually overexpressed in several tumours (Wang *et al.*, 2010), stimulates size augmentation, proliferation and ECM secretion in rat PTCs (Gnessi *et al.*, 1993; Chiarenza *et al.*, 2000), leading to the thickening of the testicular tubule wall; In addition, it has been shown that PDGF treatment up-regulates the expression of  $\alpha$ -SMA and enhances the sensitivity to endothelin in peritubular myoid cells, what could be related with a higher contractility of these cells (Romano *et al.*, 2006). Besides PDGF, Interleukin-1 $\alpha$  is also involved in testicular development as a paracrine factor; this interleukin is first expressed in the rat testis 20 days after birth, mainly by Sertoli cells, and has a mitogenic effect in both PTCs and germ cells (Svechnikov *et al.*, 2004).

Recent studies with human PTCs in culture have shown the secretory potential of these cells and their potential implications in the regulation of the testicular function (Albrecht *et al.*, 2006). Among the identified secretory products of PTCs several ECM components were found, including collagens I, IV, XVIII, fibronectin, laminin and SPARC. Together with these structural proteins, PTCs were also proven to express nerve growth factor (NGF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and inflammatory interleukins, such as IL-6 (Schell *et al.*, 2008). It has been recently proven that the secretion of all these growth factors by PTCs is regulated through TNF- $\alpha$  signalling (Schell *et al.*, 2008), a proinflammatory cytokine produced by cells of the immune system, mainly by monocytes, macrophages and mast cells. The last are known to reside within the testicular mesenchyme and increased numbers of these cells have been related with human infertility (Jezek *et al.*, 1999; Apa *et al.*, 2002).

Taken all together, these observations demonstrate that testis peritubular myoid cells are not only a structural element of the seminiferous tubules but also an active agent in the regulation of the testicular homeostasis. The secretory activity of PTCs is complexly regulated by the other components of the testicular microenvironment so also the alterations of this microenvironment, such as those originated by cancer cell-derived factors, may lead to



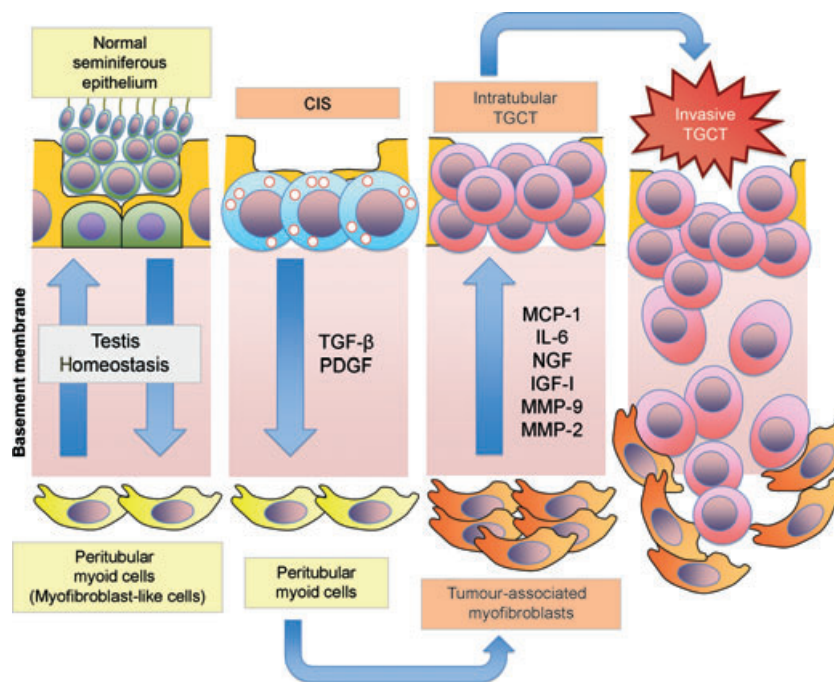
phenotypic changes in PTCs that contribute to tumour growth, invasion and metastasis.

### Peritubular myoid cells as sources of proinvasive factors

The expression of some of the PTC secretory products is frequently up-regulated in the reactive stroma of several neoplasias and has been directly related with tumour progression and poor prognosis. In view of these observations, it could be hypothesized that an alteration of the normal cell-cell interactions in the testicular ecosystem could produce an increase of PTCs proliferation or an imbalance of its secretory activity so as to create a tumour supportive microenvironment (Fig. 2).

The MCP-1, also known as Chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2), is a secretion product of PTCs that acts as a crucial mediator of acute inflammation, being involved not only in the attraction and activation of macrophages (Fujimoto *et al.*, 2009), but it has also been identified as an important regulator of the tumour microenvironment, as it is responsible for changes in both cancer and stroma cells (Gerard & Rollins, 2001; Sutton *et al.*, 2007). Macrophages represent one of the most

important components of the tumour reactive stroma and its recruitment is frequently observed in a broad variety of tumour types. Even though the original aim of macrophages recruitment is the destruction of cancer cells, there are a number of evidences demonstrating that cancer cells escape from the anti-tumoural activity of tumour-associated macrophages (Lewis & Pollard, 2006). In addition, it has been reported that macrophage infiltration correlates with angiogenesis and poor prognosis in breast carcinoma (Leek *et al.*, 2000). Further observations that support the role of macrophages in tumour progression have been made through the removal of macrophages in mice by a homozygous null mutation of the gene that encodes the macrophage growth factor, colony-stimulating factor-1 (CSF-1); interestingly, tumour growth rate and metastasis incidence were significantly reduced in these animals (Condeelis & Pollard, 2006). Macrophages infiltrate into tumour surrounding stroma in response to chemoattractants expressed in the tumour microenvironment, including PDGF (Siegbahn *et al.*, 1990), TNF- $\alpha$  (Ming *et al.*, 1987) and MCP-1 (Boring *et al.*, 1997), all of them closely related with testis peritubular myoid cells (Schell *et al.*, 2008), tumour progression and poor prognosis (Knowles *et al.*, 2004). In relation



**Figure 2** Possible role of peritubular myoid cells in the invasion process of testicular germ cell tumours: The interaction between normal seminiferous epithelium and normal testicular stroma maintains the testis homeostasis needed for a correct testicular function. When malignant cells appear there is a disruption of this homeostasis that can lead to tumour growth and invasion. CIS cells and intratubular neoplastic germ cells are known to secrete a number of growth factors, such as TGF- $\beta$  and PDGF, which could regulate the recruitment and differentiation from stromal precursors, including fibroblasts and peritubular myoid cells, into myofibroblasts. In return, these tumour-associated stroma cells secrete a series of factors supporting cancer cell growth, survival and invasion.

with these chemoattractants, a recent study has demonstrated that a higher recruitment of macrophages referable to the tumour stroma cell-derived MCP-1 contributes to tumour progression in breast carcinoma; indeed, it was observed that the treatment of mice bearing human breast cancer xenografts with MCP-1 neutralizing antibodies resulted in a significant reduction of macrophage recruitment, together with inhibited angiogenesis and tumour growth (Fujimoto *et al.*, 2009). Several studies performed during the last few years have identified some of the macrophage features related with tumour progression, these include their ability to release a large variety of tumour-promoting factors, such as angiogenic mediators, growth factors, proteolytic enzymes and immunosuppressive factors. In relation with the immune system, MCP-1 has been shown to inhibit potential anti-tumour T cell activities in breast cancer (Vitiello *et al.*, 2004). Interestingly enough, it has been reported that the proangiogenic activity of MCP-1 does not need to be mediated by leucocyte-derived factors but MCP-1 has a direct chemoattractant effect on human endothelial cells (Salcedo *et al.*, 2000). These observations suggest that the use of MCP-1 antagonists may be a useful tool for the inhibition of angiogenesis and tumour progression. This idea is further supported by recent results in human melanoma xenografts models; in these studies, the pharmacological inhibition of MCP-1 significantly reduced macrophage recruitment, angiogenesis and tumour growth (Gazzaniga *et al.*, 2007). Another macrophage-independent activity of MCP-1 has been recently reported; this is that MCP-1 enhances cancer cell survival, acting as a suppressor of autophagic death in human prostate cancer cells through the upregulation of surviving expression; the signalling pathways involved in MCP-1-mediated survival are known autophagy regulators, such as PI3K and Akt (Roca *et al.*, 2008).

Interleukine-6 is another secretion product of PTCs that has been repeatedly related with tumour progression (Ara & Declerck, 2010; Knüpfer & Preiss, 2010), more precisely, it has been identified as a potent proangiogenic cytokine (Nilsson *et al.*, 2005). Angiogenesis is a key mechanism involved in tumour growth and dissemination; an overexpression of proangiogenic factors may lead to the migration and proliferation of endothelial precursor cells that eventually form new blood vessels. This tumour neovascularization provides nutrients and oxygen to the developing tumour, including TGCTs (Silván *et al.*, 2010b). IL-6 is known to be a key mediator of many physiological processes, including haematopoiesis, osteoclast activation and B lymphocyte differentiation (Hirano, 1998) but, in the last years, it has been also associated with tumour progression. Women with ovarian carcinoma usually present elevated serum levels of IL-6 that

correlates with poor clinical outcome (Tempfer *et al.*, 1997). A significant number of independent studies support the proangiogenic role of IL-6; it has been reported, for example, that IL-6 induces VEGF secretion in cervical cancer cells and glioblastoma cells (Cohen *et al.*, 1996). IL-6 has also been found to stimulate cerebellum hypervascularization in transgenic mice (Campbell *et al.*, 1993) and to induce cerebral endothelial cell proliferation in vitro (Fee *et al.*, 2000). On the other hand, it has been shown that IL-6 deficient mice present reduced angiogenic responses in wounds and significantly prolonged wound healing times (Lin *et al.*, 2003). In addition, IL-6 proangiogenic activity seems to have a physiological function during the maturation of the ovarian follicle (Motro *et al.*, 1990). Interestingly, it has been observed that IL-6 could collaborate with MCP-1 in the recruitment of tumour-associated macrophages, because the last has a chemoattractant effect on circulating monocytes and IL-6 has been reported to induce the differentiation of monocytes into macrophages (Duluc *et al.*, 2007). The importance of IL-6 signalling as a potential therapeutic target has been recently shown in an experimental model of myeloma, in which the treatment with genetically modified tocilizumab, a humanized anti-IL-6 receptor monoclonal antibody which specifically blocks IL-6 signalling, led to a significant reduction of tumour growth (Yoshio-Hoshino *et al.*, 2007).

As we have previously mentioned, testicular myoid cells secrete nerve growth factor (NGF) (Schell *et al.*, 2008), a cytokine that has been recently associated with tumour growth, invasion and metastasis. There is a broad spectrum of tumours where the expression of NGF or its receptors has been detected, such as breast (Descamps *et al.*, 2001), pancreas (Sakamoto *et al.*, 2001), hepatocellular (Tokusashi *et al.*, 2005) and prostate carcinomas (Djakiew *et al.*, 1991), in the last NGF has been described as a mediator of the tumour-stroma interaction. Roles of NGF signalling in metastasis and tumour prognosis have been suggested for malignant melanoma (Marchetti *et al.*, 1993) and small cell lung cancer cells (Missale *et al.*, 1998). In addition, it has been demonstrated that NGF has a mitogenic effect on several breast cancer cell lines through the activation of TrkA and its downstream MAP Kinase cascade (Koizumi *et al.*, 1998). Moreover, NGF has been also identified as a mediator of breast carcinoma cell survival through the activation of its other receptor P75NR (Descamps *et al.*, 2001).

The insulin-like growth factor (IGF) signalling regulates cell growth and differentiation, what makes it a crucial factor in developmental processes and in tumour progression (Zhang *et al.*, 2003). IGF-I is secreted by most of the testicular cell populations, including peritubular myoid cells, and is involved in the modulation of several

processes in the healthy testis, such as testosterone production, Sertoli cell homeostasis and spermatogenesis (Lin *et al.*, 1986; Froment *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Interestingly, IGF-I has also been identified as a key regulator of the SDF-1/CXCR4 signalling pathway, whose function is necessary for the proper migration of PGC (Schlueter *et al.*, 2007) and has been associated with the metastatic pattern of several carcinomas, including TGCTs. Indeed, TGCTs exhibit an outstanding conserved pattern of metastases to organs that express high levels of SDF-1, such as lymph nodes, lungs and bone; resembling patterns observed in other CXCR4 over-expressing cancers (breast, colorectal, prostate) (Gilbert *et al.*, 2009). The formation of site-specific metastases requires full compatibility between the tumour cell features and the host organ microenvironment. Indeed, it has been demonstrated that viability of circulating metastatic cancer cells is higher if they are incorporated in heterotypic tumour–stroma cell fragments and that the presence of primary tumour stroma cells in metastatic sites increases early metastatic tumour growth (Duda *et al.*, 2010). The localization of SDF-1-expressing primary tumour stroma cells in TGCT metastasis would have special significance as it could be directly involved in the attraction of circulating cancer cells. Previous studies on the expression pattern of IGF system members have shown that IGF-I and IGFBP-5 are highly expressed in CIS cells and the co-expression of these factors in some CIS cells could be related with the transition from CIS to invasive tumour by the increase of proliferation (Drescher *et al.*, 1997). They are also able to upregulate proliferation-related genes and repress differentiation-related genes. In fact, it has been recently shown that Leydig cell-derived IGF-I mediates the maintenance of spermatogonial stem cell pluripotency and conferred on them a PGC-like phenotype through PI3K pathway (Huang *et al.*, 2009), thus, the known expression of this growth factor by testicular stroma cells could be related to TGCT progression. The IGF system can also facilitate tumour invasion by inducing the expression of several proteolytic enzymes, mainly of the MMP family. Thus, IGF-IR has been shown to upregulate the expression of MMP-2 and MT1-MMP, (Zhang *et al.*, 2003) two proteases involved in matrix degradation and directional cell migration and whose overexpression is highly related with the formation of metastases. The activity of MMPs is not limited to the disruption of the extracellular matrix but also contributes to tumour progression by the activation of growth factors involved in cell proliferation, survival and angiogenesis (Kessenbrock *et al.*, 2010). Taken together, these data support a role for the peritubular myoid cell-secreted IGF-I as a promising target in TGCT therapy because it seems to mediate several metastasis-associated features,

such as proliferation, migration, angiogenesis and apoptosis resistance. In fact, several inhibitors of IGF-1R are being currently tested in clinical trials against other tumour types (Tao *et al.*, 2007; Ulanet *et al.*, 2010).

All these observations point to peritubular myoid cells as an important agent to be taken into account in further studies of testicular germ cell tumour development and as a potential target for future anticancer therapies.

### **ES cell transplantation into the seminiferous tubules: a useful technique for the study of TGCT reactive stroma**

Our group has previously developed an *in vivo* model of TGCTs based on the transplantation of ES cells into the seminiferous tubules (Silván *et al.*, 2010a). As CIS of the testis and ES cells share many common features (Almstrup *et al.*, 2006; Rajpert-De Meyts, 2006), we believe that the model mimics in many ways the spontaneous TGCT formation and progression. In fact, short time after the transplantation procedure, ES cells can be found in a basal position of the germinal epithelium, the same location where the CIS cells appear (Skakkebaek, 1975). Few weeks after the transplantation, an invasive tumour showing the histological aspect of spontaneous TGCTs is formed. One evident advantage of this approach likened to the previously existing models, such as animals with higher TGCT incidence or the use of carcinogenic drugs, is the possibility of modifying the ES cells prior to their transplantation. This modification may comprise the incorporation of marker genes, such as *GFP* or  *$\beta$ -galactosidase*, which allows distinguishing between cancer and stromal cells in the formed tumours. It would be as well possible to up- or downregulate genes related to tumour progression, metastasis and vascularization.

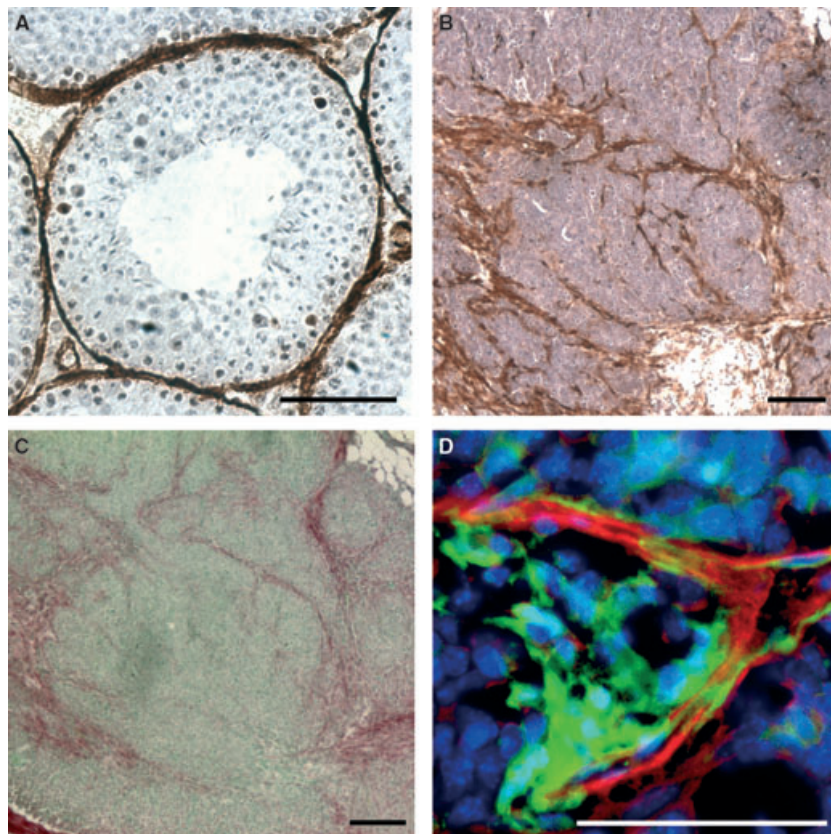
Using corrosion casting and scanning electron microscopy we described the vascular pattern of the experimental TGCTs. The tumours showed higher vessel density and wider vessel diameters than the healthy testis, being the overall characteristics of those of an immature vascular bed (Silván *et al.*, 2009a). Further genetic analysis of the formed tumours revealed that the vasculogenic process is linked to the overexpression of several pro-angiogenic factors such as VEGF and its receptors (Silván *et al.*, 2010b). In addition, the vascular architecture suggested the existence of large hypoxic regions inside the experimental tumours. To unravel the effect of this hypoxic microenvironment on the transplanted cells as well as on the stem cell component of teratocarcinoma, we analysed the proliferation and expression of several genes in ES and EC cells cultured under low oxygen concentrations. Both, EC and ES cells proliferated faster and showed an increased expression of several vasculogenesis-

related genes, such as *VEGF-A* and *PIGF*, when cultured under 5% O<sub>2</sub> in comparison to those maintained at atmospheric O<sub>2</sub> concentrations. The expression of MMP-2, a key protease in the angiogenic process, also appeared increased in the hypoxic cultures of ES cells (Silván *et al.*, 2009b).

Nevertheless, the ES transplantation technique can as well be useful in the study of the stromal reaction in TGCTs. As previously mentioned, in the healthy mouse testis PTCs are arranged forming a thin layer surrounding the seminiferous tubules, as assessed by immunohistochemistry against  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) (Fig. 3A). In turn, the experimental tumours displayed a dramatic increment of  $\alpha$ SMA-positive cells, forming thick layers that surround the cancer cells (Fig. 3B and D). Furthermore, these cells secrete large amounts of collagen, as seen by Sirius Red staining (Fig. 3C). Prior to the transplantation procedure ES cells had been transfected with GFP and thus cryostat sections allowed us to study the interaction between the

autofluorescent carcinogenic component and the stroma cells of the tumours (Fig. 3A).

A step further would be the transplantation in the same testis of ES cells in the seminiferous tubules and PTCs in the intratubular compartment. As both cell types could contain genetic modifications, this approach would represent a valuable model to determine the importance of different genes when expressed in distinct tumour components and, more interestingly, may allow studying the interplay between the non-tumourigenic and the tumourigenic cells of the tumour. For example, it would be very exciting to knockdown those genes that appear overexpressed in the tumours and determine the contribution of each tumoural component to different tumoural processes, such as invasion, vasculogenesis and metastasis. We believe that this approach may be of great utility to better understand the mechanisms of the CIS transformation into invasive carcinoma and the role of the testicular stroma in TGCT progression.



**Figure 3** Main histological changes of the stroma in experimental teratocarcinomas: (A) In the healthy testis, peritubular myoid cells (dark brown) appear surrounding the seminiferous tubules. (B) Paraffin sections of a tumour sample reveal a huge increase in the number of  $\alpha$ SMA-positive cells, corresponding to cancer-associated myofibroblast. (C) Sirius Red staining of collagen in a tumour sample, this collagen is mainly secreted by the tumour stromal cells. (D) Cryostat section of an experimental testicular teratocarcinoma shows PTCs stained with an SMA-specific antibody (red) 'embracing' the transplanted cells (GFP, green). Scale bars represent 50  $\mu$ m in (A) and (D) and 100  $\mu$ m in (B) and (C).

## Conclusions

Regardless of the growing number of data that support the role of cancer-associated stromal cells in tumour progression, our ignorance with respect to the role of reactive stroma cells in the development of testicular germ cell tumours is still quite high. For this reason, we have summarized in this review several data that support the potential role of peritubular myoid cells (PTCs) as the precursors of tumour-associated myofibroblasts and as source of several proinvasive factors that could mediate the testicular germ cell tumour progression. The crosstalk between cancer cells and myofibroblasts is a crucial process for invasive growth and has been correlated with a poor clinical prognosis. Although PTCs are one of the less known cells of the human testis, recent studies have demonstrated that these cells are not mere structural elements of the seminiferous tubules. Indeed, Human PTCs are active secretory cells that regulate the normal function of other cell types of the human testis. Consequently, they have the potential to regulate the homeostasis of the testicular environment and may also be involved in the development of testicular germ cell tumours. The described experimental teratocarcinoma model based on the transplantation of ES cells into the seminiferous tubules will provide further insight into the functions of testicular reactive stroma cells and their involvement in the origin and progression of testicular germ cell tumours. Future methods to address these kinds of tumours should take into account the examination of the stromal reaction and the development of therapeutic approaches with the scope of preventing the formation of a myofibroblast rich stroma.

## Acknowledgements

The authors thank Mr. Juan Luis Vidaurrazaga for his excellent editorial assistance. This work was supported by a research project from the Spanish Ministry of Education and Science (BFU 2007-66610) and a Research Group Grant (IT560-10) from the Basque Government to J. Aréchaga; U. Silván had a pre-doctoral fellowship from the University of the Basque Country. A. Díez-Torre and P. Moreno had support from the Jesús Gangoiti Barrera Foundation, Bilbao, Spain.

## References

Ailenberg M, Tung PS, Pelletier M & Fritz IB (1988) Modulation of Sertoli cell functions in the two-chamber assembly by peritubular cells and extracellular matrix. *Endocrinology* 122, 2604–2612.

Albrecht M, Ramsch R, Kohn FM, Schwarzer JU & Mayerhofer A (2006) Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1956–1960.

Almstrup K, Sonne SB, Hoei-Hansen CE, Ottesen AM, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Leffers H & Rajpert-De Meyts E (2006) From embryonic stem cells to testicular germ cell cancer - should we be concerned? *Int J Androl* 29, 211–218.

Andrews PW, Matin MM, Bahrami AR, Damjanov I, Gokhale P & Draper JS (2005) Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans* 33, 1526–1530.

Anthony CT, Kovacs WJ & Skinner MK (1989) Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with a microassay that uses an affinity ligand. *Endocrinology* 125, 2628–2635.

Apa DD, Cayan S, Polat A & Akbay E (2002) Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch Androl* 48, 337–344.

Ara T & Declerck YA (2010) Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* 46, 1223–1231.

Ardies CM (2003) Inflammation as cause for scar cancers of the lung. *Integr Cancer Ther* 2, 238–246.

Balanathan P, Williams ED, Wang H, Pedersen JS, Horvath LG, Achen MG, Stacker SA & Risbridger GP (2009) Elevated level of inhibin-alpha subunit is pro-tumourigenic and pro-metastatic and associated with extracapsular spread in advanced prostate cancer. *Br J Cancer* 100, 1784–1793.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H & Tomic-Canic M (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16, 585–601.

Beppu H, Mwizerwa ON, Beppu Y, Dattwyler MP, Lauwers GY, Bloch KD & Goldstein AM (2008) Stromal inactivation of BMPRII leads to colorectal epithelial overgrowth and polyp formation. *Oncogene* 27, 1063–1070.

Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG & Moses HL (2004) TGF- $\beta$  signalling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 303, 848–851.

Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr, Broxmeyer HE & Charo IF (1997) Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knock-out mice. *J Clin Invest* 100, 2552–2561.

Brandli DW, Ulbright TM, Foster RS, Cummings OW, Zhang S, Sweehey CJ, Eble JN & Cheng L (2003) Stroma adjacent to metastatic mature teratoma after chemotherapy for testicular germ cell tumors is derived from the same progenitor cells as the teratoma. *Cancer Res* 63, 6063–6068.

Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB & Mucke L (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10061–10065.

Chia VM, Quraishi SM, Devesa SS, Purdue MP, Cook MB & McGlynn KA (2010) International trends in the incidence of testicular cancer 1973–2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19, 1151–1159.

Chiarenza C, Filippini A, Tripiciano A, Beccari E & Palombi F (2000) PDGF-BB stimulates hypertrophy of peritubular smooth muscle cells from rat testis in primary cultures. *Endocrinology* 141, 2971–2981.

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G & Levi BZ (1996) Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271, 736–741.

Condeelis J & Pollard JW (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion and metastasis. *Cell* 124, 263–266.

Condon M & Bosland M (1999) The role of stromal cells in prostate cancer development and progression. *In Vivo* 13, 61–66.

- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF & Seidl K (1990) Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 262, 253–261.
- De Wever O & Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200, 429–447.
- De Wever O, Nguyen Q-D, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C & Mareel M (2004) Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts *in vitro* provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* 18, 1016–1018.
- De Wever O, Demetter P, Mareel M & Bracke M (2008) Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 123, 2229–2238.
- Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, Le Bourhis X, Boilly B, Peyrat JP & Hondermarck H (2001) Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 276, 17864–17870.
- Desmoulière A, Guyot C & Gabbiani G (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 48, 509–517.
- Díez-Torre A, Silván U, De Wever O, Bruyneel E, Mareel M & Aréchaga J (2004) Germinal tumor invasion and the role of the testicular stroma. *Int J Dev Biol* 48, 545–557.
- Dingemans KP, Zeeman-Boeschoten IM, Keep RF & Das PK (1993) Transplantation of colon carcinoma into granulation tissue induces an invasive morphotype. *Int J Cancer* 54, 1010–1016.
- Djakiew D, Delsite R, Pflug B, Wrathall J, Lynch JH & Onoda M (1991) Regulation of growth by a nerve growth factor-like protein which modulates paracrine interactions between a neoplastic epithelial cell line and stromal cells of the human prostate. *Cancer Res* 51, 3304–3310.
- Drescher B, Lauke H, Hartmann M, Davidoff MS & Zumkeller W (1997) Immunohistochemical pattern of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF II and IGF binding proteins 1 to 6 in carcinoma *in situ* of the testis. *Mol Pathol* 50, 298–303.
- Duda DG, Duyverman AM, Kohno M, Snuderl M, Steller EJ, Fukumura D & Jain RK (2010) Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 21677–21682.
- Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J *et al.* (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110, 4319–4330.
- El Ramy R, Verot A, Mazaud S, Odet F, Magre S & Le Magueresse-Battistoni B (2005) Fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF9 mediate mesenchymal–epithelial interactions of peritubular and Sertoli cells in the rat testis. *J Endocrinol* 187, 135–147.
- Elliott BE, Maxwell L, Arnold M, Wei WZ & Miller FR (1988) Expression of epithelial-like markers and class I major histocompatibility antigens by a murine carcinoma growing in the mammary gland and in metastases: orthotopic site effects. *Cancer Res* 48, 7237–7245.
- Fee D, Grzybicki D, Dobbs M, Ihyer S, Clotfelter J, Macvilay S, Hart MN, Sandor M & Fabry Z (2000) Interleukin 6 promotes vasculogenesis of murine brain microvessel endothelial cells. *Cytokine* 12, 655–665.
- Froment P, Vigier M, Nègre D, Fontaine I, Beghelli J, Cosset FL, Holzenberger M & Durand P (2007) Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *J Endocrinol* 194, 557–568.
- Fujimoto H, Sangai T, Ishii G, Ikehara A, Nagashima T, Miyazaki M & Ochiai A (2009) Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *Int J Cancer* 125, 1276–1284.
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K & Sahai E (2007) Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 9, 1392–1400.
- Gazzaniga S, Bravo AI, Guglielmotti A, van Rooijen N, Maschi F, Vecchi A, Mantovani A, Mordoh J & Wainstok R (2007) Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J Invest Dermatol* 127, 2031–2041.
- Gerard C & Rollins BJ (2001) Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2, 108–115.
- Gilbert DC, Chandler I, McIntyre A, Goddard NC, Gabe R, Huddart RA & Shipley J (2009) Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents. *J Pathol* 217, 94–102.
- Gnessi L, Emidi A, Scarpa S, Palleschi S, Ragano-Caracciolo M, Silvestroni L, Modesti A & Spera G (1993) PDGF effects on purified testicular peritubular myoid cells: binding, cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase, mitogenic activity and extracellular matrix production enhancement. *Endocrinology* 133, 1880–1890.
- Gonda TA, Varro A, Wang TC & Tycko B (2010) Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin Cell Dev Biol* 21, 2–10.
- Granot D, Addadi Y, Kalchenko V, Harmelin A, Kunz-Schughart LA & Neeman M (2007) *In vivo* imaging of the systemic recruitment of fibroblasts to the angiogenic rim of ovarian carcinoma tumors. *Cancer Res* 67, 9180–9189.
- Greene MH, Kratz CP, Mai PL, Mueller C, Peters JA, Bratslavsky G *et al.* (2010) Familial testicular germ cell tumors in adults: 2010 summary of genetic risk factors and clinical phenotype. *Endocr Relat Cancer* 17, 109–121.
- Habashy HO, Powe DG, Staka CM, Rakha EA, Ball G, Green AR *et al.* (2010) Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 119, 283–293.
- Hill R, Song Y, Cardiff RD & Van Dyke T (2005) Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell* 123, 1001–1011.
- Hirano T (1998) Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16, 249–284.
- Holstein AF, Maekawa M, Nagano T & Davidoff MS (1996) Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol* 59, 109–125.
- Hooper S, Gaggioli C & Sahai E (2010) A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion. *Br J Cancer* 102, 392–402.
- Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, Shen CN, Kuo HC *et al.* (2009) Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. *FASEB J* 23, 2076–2087.
- Ježek D, Banek L, Hittmair A, Pezerovic-Panijan R, Golzuza T & Schulze W (1999) Mast cells in testicular biopsies of infertile men with ‘mixed atrophy’ of seminiferous tubules. *Andrologia* 31, 203–210.
- Kessenbrock K, Plaks V & Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52–67.

- Knowles H, Leek R & Harris AL (2004) Macrophage infiltration and angiogenesis in human malignancy. *Novartis Found Symp* 256, 189–200.
- Knüpfner H & Preiss R (2010) Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients: a summary of published results. *Int J Colorectal Dis* 25, 135–140.
- Koizumi H, Morita M, Mikami S, Shibayama E & Uchikoshi T (1998) Immunohistochemical analysis of TrkA neurotrophin receptor expression in human non-neuronal carcinomas. *Pathol Int* 48, 93–101.
- Konrad L, Albrecht M, Renneberg H & Aumüller G (2000a) Transforming growth factor-beta2 mediates mesenchymal–epithelial interactions of testicular somatic cells. *Endocrinology* 141, 3679–3686.
- Konrad L, Albrecht M, Renneberg H, Ulrich W, Hoeben E, Verhoeven G & Aumüller G (2000b) Mesenchymal entactin-1 (nidogen-1) is required for adhesion of peritubular cells of the rat testis *in vitro*. *Eur J Cell Biol* 79, 112–120.
- Kramer S, Marcial VA, Pajak TF, MacLean CJ & Davis LW (1986) Prognostic factors for loco/regional control and metastasis and the impact on survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12, 573–578.
- Kristensen DM, Sonne SB, Ottesen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Leffers H & Meyers ER (2008) Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 288, 111–118.
- Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA & Harris AL (2000) Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 190, 430–436.
- Lewis CE & Pollard JW (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66, 605–612.
- Li Y, Oral O, Abe K, Eto K & Abé S (2008) The roles of pericyclic cells and Sertoli cells in spermatogonial proliferation stimulated by some growth factors in organ culture of newt (*Cynops pyrrhogaster*) testis. *Gen Comp Endocrinol* 159, 80–87.
- Lin T, Haskell J, Vinson N & Terracio L (1986) Direct stimulatory effects of insulin-like growth factor-I on Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 137, 950–956.
- Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T & Mukaida N (2003) Essential involvement of IL-6 in the skin woundhealing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* 73, 713–721.
- Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Loning S, Teicher BA & Lee C (2007) Tumor evasion of the immune system by converting CD4 + CD25- T cells into CD4 + CD25 + T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* 178, 2883–2892.
- Mackay S & Smith RA (2007) Effects of growth factors on testicular morphogenesis. *Int Rev Cytol* 260, 113–173.
- Maekawa M, Kamimura K & Nagano T (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* 59, 1–13.
- Marchetti D, Menter D, Jin L, Nakajima M & Nicolson GL (1993) Nerve growth factor effects on human and mouse melanoma cell invasion and heparinase production. *Int J Cancer* 55, 692–699.
- Mareel MM, De Baetselier P & Van Roy FM (1991) Mechanisms of Invasion and Metastasis. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ming WJ, Bersani L & Mantovani A (1987) Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 138, 1469–1474.
- Mink SR, Vashistha S, Zhang W, Hodge A, Agus DB & Jain A (2010) Cancer-associated fibroblasts derived from EGFR-TKI-resistant tumors reverse EGFR pathway inhibition by EGFR-TKIs. *Mol Cancer Res* 8, 809–820.
- Missale C, Codignola A, Sigala S, Finardi A, Paez-Pereda M, Sher E & Spano PF (1998) Nerve growth factor abrogates the tumorigenicity of human small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5366–5371.
- Motro B, Itin A, Sachs L & Keshet E (1990) Pattern of interleukin 6 gene expression *in vivo* suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3092–3096.
- Mourskaia AA, Dong Z, Ng S, Banville M, Zwaagstra JC, O'Connor-McCourt MD & Siegel PM (2009) Transforming growth factor-beta1 is the predominant isoform required for breast cancer cell outgrowth in bone. *Oncogene* 28, 1005–1015.
- Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Friese K & Gerber B (2005) Inhibin/activin subunits (inhibin-alpha, -betaA and -betaB) are differentially expressed in human breast cancer and their metastasis. *Oncol Rep* 13, 81–88.
- Nilsson MB, Langley RR & Fidler IJ (2005) Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res* 65, 10794–10800.
- Ohtani H (1999) Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue: desmoplasia and tumor immunity. *Tohoku J Exp Med* 187, 193–202.
- Olie RA, Boersma AW, Dekker MC, Nooter K, Looijenga LH & Oosterhuis JW (1996) Apoptosis of human seminoma cells upon disruption of their microenvironment. *Br J Cancer* 73, 1031–1036.
- Oosterhuis JW & Looijenga LH (2005) Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5, 210–222.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL & Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335–348.
- Ormestad M, Astorga J, Landgren H, Wang T, Johansson BR, Miura N & Carlsson P (2006) Foxf1 and Foxf2 control murine gut development by limiting mesenchymal *Wnt* signaling and promoting extracellular matrix production. *Development* 133, 833–843.
- Park S, Yoon SY, Kim KE, Lee HR, Hur DY, Song H, Kim D, Bang SI & Cho DH (2009) Interleukin-18 induces transferrin expression in breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Lett* 286, 189–195.
- Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P & Eng C (2007) Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med* 357, 2543–2551.
- Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL & Kang AH (1987) Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 165, 251–256.
- Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE *et al.* (2005) Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123–127.
- Rajpert-De Meyts E (2006) Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma *in situ*: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* 12, 303–323.
- Richiardi L, Pettersson A & Akre O (2007) Genetic and environmental risk factors for testicular cancer. *Int J Androl* 30, 230–240.
- Roca H, Varsos Z & Pienta KJ (2008) CCL2 protects prostate cancer PC3 cells from autophagic death via PI3K/AKT-dependent survivin up-regulation. *J Biol Chem* 283, 25057–25073.
- Romano F, Tripiciano A, Muciaccia B, De Cesaris P, Ziparo E, Palombi F & Filippini A (2005) The contractile phenotype of peritubular

- smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. *Contraception* 72, 294–297.
- Romano F, Chiarenza C, Palombi F, Filippini A, Padula F, Ziparo E & De Cesaris P (2006) Platelet-derived growth factor-BB-induced hypertrophy of peritubular smooth muscle cells is mediated by activation of p38 MAP-kinase and of Rho-kinase. *J Cell Physiol* 207, 123–131.
- Rønnov-Jessen L & Petersen OW (1993) Induction of  $\alpha$ -smooth muscle actin by transforming growth factor- $\beta$ 1 in quiescent human breast gland fibroblasts: implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* 68, 696–707.
- Rossi F, Ferraresi A, Romagni P, Silvestroni L & Santemma V (2002) Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells *in vitro*. *Endocrinology* 143, 3096–3104.
- Sakamoto Y, Kitajima Y, Edakuni G, Sasatomi E, Mori M, Kitahara K & Miyazaki K (2001) Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 8, 477–484.
- Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ & Murphy WJ (2000) Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96, 34–40.
- Schell C, Albrecht M, Mayer C, Schwarzer JU, Frungieri MB & Mayrhofer A (2008) Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Endocrinology* 149, 1678–1686.
- Schlueter PJ, Sang X, Duan C & Wood AW (2007) Insulin-like growth factor receptor 1b is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Dev Biol* 305, 377–387.
- Siegbahn A, Hammacher A, Westermark B & Heldin CH (1990) Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest* 85, 916–920.
- Silván U, Arluzea J, Andrade R, Díez-Torre A, Silió M, Konerding MA & Aréchaga J (2009a) Angiogenesis and vascular network of teratocarcinoma from embryonic stem cell transplant into seminiferous tubules. *Br J Cancer* 101, 64–70.
- Silván U, Díez-Torre A, Arluzea J, Andrade R, Silió M & Aréchaga J (2009b) Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation* 78, 159–168.
- Silván U, Díez-Torre A, Jiménez-Rojo L & Aréchaga J (2010a) Vascularization of testicular germ cell tumours: evidence from experimental teratocarcinomas. *Int J Androl* 33, 765–774.
- Silván U, Díez-Torre A, Andrade R, Arluzea J, Silió M & Aréchaga J (2010b) Embryonic stem cell transplantation into the seminiferous tubules. A model for the study of invasive germ cell tumors of the testis. *Cell Transplant*. Doi:10.3727/096368910X536581. [Epub ahead of print].
- Skakkebaek NE (1975) Atypical germ cells in the adjacent “normal” tissue of testicular tumours. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 83, 127–130.
- Sutton A, Friand V, Brulé-Donneger S, Chaigneau T, Zioli M, Sainte-Catherine O *et al.* (2007) Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol Cancer Res* 5, 21–33.
- Svechnikov K, Petersen C, Sultana T, Wahlgren A, Zetterström C, Colón E, Bornestaf C & Söder O (2004) The paracrine role played by interleukin-1  $\alpha$  in the testis. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4, 67–74.
- Tao Y, Pinzi V, Bourhis J & Deutsch E (2007) Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway – therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 591–602.
- Tempfer C, Zeisler H, Sliutz G, Haeusler G, Hanzal E & Kainz C (1997) Serum evaluation of interleukin 6 in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 66, 27–30.
- Timmer A, Oosterhuis JW, Schraffordt Koops H, Sleijfer DT, Szabo BG & Timens W (1994) The tumor microenvironment: possible role of integrins and the extracellular matrix in tumor biological behavior of intratubular germ cell neoplasia and testicular seminomas. *Am J Pathol* 144, 1035–1044.
- Tokusashi Y, Asai K, Tamakawa S, Yamamoto M, Yoshie M, Yaginuma Y *et al.* (2005) Expression of NGF in hepatocellular carcinoma cells with its receptors in non-tumor cell components. *Int J Cancer* 114, 39–45.
- Townsend JS, Richardson LC & German RR (2010) Incidence of testicular cancer in the United States 1999–2004. *Am J Mens Health* 4, 353–360.
- Ulanet DB, Ludwig DL, Kahn CR & Hanahan D (2010) Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to IGF-1R targeted therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 10791–10798.
- Verhoeven G, Hoeber E & De Gendt K (2000) Peritubular cell-Sertoli cell interactions: factors involved in PmodS activity. *Andrologia* 32, 42–45.
- Vitiello PF, Shainheit MG, Allison EM, Adler EP & Kurt RA (2004) Impact of tumor-derived CCL2 on T cell effector function. *Immunol Lett* 91, 239–245.
- Walschaerts M, Huyghe E, Muller A, Bachaud JM, Bujan L & Thonneau P (2008) Doubling of testicular cancer incidence rate over the last 20 years in Southern France. *Cancer Causes Control* 19, 155–161.
- Wang Z, Ahmad A, Li Y, Kong D, Azmi AS, Banerjee S & Sarkar FH (2010) Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression. *Biochim Biophys Acta* 1806, 122–130.
- Weber MA, Groos S, Aumüller G & Konrad L (2002) Post-natal development of the rat testis: steroid hormone receptor distribution and extracellular matrix deposition. *Andrologia* 34, 41–54.
- Xing F, Saidou J & Watabe K (2010) Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci* 15, 166–179.
- Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Aoki C, Pereboev A, Curiel DT & Nishimoto N (2007) Establishment of a new interleukin-6 (IL-6) receptor inhibitor applicable to the gene therapy for IL-6-dependent tumor. *Cancer Res* 67, 871–875.
- Zhang D, Samani AA & Brodt P (2003) The role of the IGF-I receptor in the regulation of matrix metalloproteinases, tumor invasion and metastasis. *Horm Metab Res* 35, 802–808.
- Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY *et al.* (2006) Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 17718–17723.
- Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenel-lenbogen BS & Hess RA (2002) Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 23, 870–881.
- Zigrino P, Löffek S & Mauch C (2005) Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* 87, 321–328.

## Panel discussion

**N. E. Skakkebaek** (Copenhagen, Denmark)

You focussed on the very important event when the CIS cells break through the seminiferous tubules to start the



invasive process. Our experience of early invasion, before the tumour differentiates into seminoma or non-seminoma, is that an infiltrate of small mononuclear cells is present around the tubules even before the CIS cells break through. Do these cells fit into your model?

**J. Aréchaga** (Leioa, Spain)

These mononuclear cells such as lymphocytes and macrophages produce proteases and cytokines which are important for the invasion process. However, the myofibroblast is more important and is the key player in this process being closer to the pluripotent stem cells. These cells are an unexplored element in the germ cell tumour – stroma interactions and are associated with progression and tissue hypoxia.

**K. Loveland** (Clayton, Australia)

Does myofibroblast function respond to changes in hormone stimulation?

**J. Aréchaga**

The layer of peritubular myofibroblasts is very thick in CIS tubules, and much thicker than around normal seminiferous tubules. They probably respond to hormones although this has not been assessed experimentally.

**J. Wolter Oosterhuis** (Rotterdam, the Netherlands)

You injected embryonal carcinoma (EC) cells into seminiferous tubules; and you showed pictures of the early

colonization of the tubules at 36 h, and the established invasive malignant teratoma in the testis at day 40 which had differentiated and undifferentiated elements. What are the intermediate stages?

**J. Aréchaga**

Serial studies are required to assess the progression of events. The invasive cells probably behave like cancerous pluripotent cells and perforate through the basement membrane. There is then interaction between the CIS cells and the stroma, and the CIS cell is transformed to a stem cell when it enters the stroma.

**J. Wolter Oosterhuis**

In humans, the CIS cell is reprogrammed within the tubule and proliferates as EC cells. Differentiation only occurs after it has become invasive.

**J. Aréchaga**

The CIS cell does not differentiate within the tubule. It is analogous to the embryo which requires two elements for differentiation, the mesenchyme and epithelium. I would like to comment on terminology and advocate that 'carcinoma in situ' is the correct name for the intratubular malignancy because it originates from the germinal epithelium of the tubule. If 'CIS' is not the correct name, then histologists must change the name of 'seminiferous epithelium'.

# The spermatogonial stem cell niche in testicular germ cell tumors

UNAI SILVÁN<sup>1,#</sup>, ALEJANDRO DÍEZ-TORRE<sup>2</sup>, PABLO MORENO<sup>1</sup>, JON ARLUZZA<sup>1,2</sup>,  
RICARDO ANDRADE<sup>2</sup>, MARGARITA SILIÓ<sup>1</sup> and JUAN ARÉCHAGA<sup>\*,1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Stem Cells, Development and Cancer, Department of Cell Biology and Histology and <sup>2</sup>Analytical and High Resolution Biomedical Microscopy Core Facility, University of the Basque Country, Vizcaya, Spain

**ABSTRACT** Spermatogonial stem cells (SSCs) are pluripotent elements found in the adult seminiferous epithelium between Sertoli cells and a basal lamina which covers the multilayered external wall of peritubular myoid cells. The microenvironment of this pluripotent stem cell niche creates the complex and dynamic system that is necessary for the initiation of spermatogenesis, but this system also contains factors which can potentially collaborate in the progression of testicular germ cell tumors (TGCTs). In this review, we summarize our current knowledge about some important structural and molecular features related to the SSC niche, including growth factors, adhesion molecules, extracellular matrix, mechanical stress and vascularization. We discuss their possible collaborative effects on the generation and progression of TGCTs, which are a type of cancer representing the most frequent neoplasia among young men and whose incidence has grown very quickly during the past decades in North America and Europe. In this regard, a better understanding of the pluripotent stem cell niche where these malignancies arise will provide further insights into the origin of TGCTs and the mechanisms underlying their growth and invasion of adjacent and distant tissues.

**KEY WORDS:** *testis, spermatogonia, germ cell tumor, embryonal carcinoma, teratocarcinoma, cancer stem cell*

## Introduction

Stem cells (SC) perpetuation is one of the main factors for the maintenance of tissue homeostasis in mammals and other vertebrates. During embryonic development SC give rise to a variety of tissues as they acquire a commitment toward a particular cell lineage, producing differentiated cell types and preserving a self-renewing population of undifferentiated cells. The plasticity of the resulting stem cell reservoir in adult tissues is variable. In most of the cases, these cells are committed to differentiate into organ-specific cell types (unipotent SC), while in other cases, like in the hematopoietic cell lineages (multipotent SC) or the germ line (pluripotent SC) give rise to a number of cell types under the appropriate conditions. The microenvironment that regulates the plasticity and fate of SC is known as “stem cell niche” (SC niche), and is composed of a mixture of chemical and physical signals provided by a number of related cells.

The concept of the SC niche was first coined in relation with the hematopoietic SC microenvironment at the bone marrow (Schofield,

1978). Since then, many other tissue-specific SC niches have been identified and characterized, including that of spermatogonial SCs. Research on SC niches has shown that microenvironment plays a key role on SC fate and that the dysfunction of any of its components can drive to the loss of tissue homeostasis and subsequently to different pathological conditions, from degenerative diseases to cancer (Blagoev, 2011; Bonafè et al., 2012). Interest-

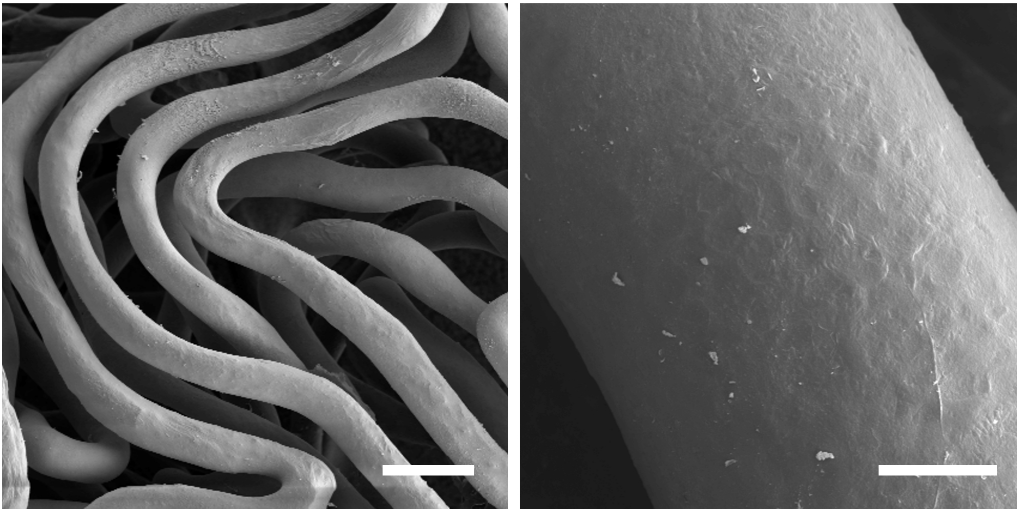
---

*Abbreviations used in this paper:* CAM, cell adhesion molecule; CIS, carcinoma in situ; CSC, cancer stem cell; CSF-1, colony stimulating factor one; Csf1r, CSF-1 receptor; E-cadherin, epithelial cadherin; EC, embryonal carcinoma; ECM, extracellular matrix; EGF, epithelial growth factor; ES cell, embryonic stem cell; FGF2, fibroblast growth factor 2; GCT, germ cell tumor; GDNF, glial-derived neurotrophic factor; GFR, GDNF family receptor; HIF-1, hypoxia inducible factor one; IF, intermediate filament; LIF, leukemia inhibitory factor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein one; MT, microtubule; N-cadherin, neural-cadherin; NGF, nerve growth factor; PIGF, placental-like growth factor; PM cell, peritubular myoid cell; SMA, smooth muscle actin; SSC, spermatogonial stem cell; TGCT, testicular germ cell tumor; VE-cadherin, vascular-endothelial cadherin.

\*Address correspondence to: Juan Aréchaga. Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country, 48940 Leioa, Vizcaya, Spain. Fax: +34-94-601-3266. e-mail: juan.arechaga@ehu.es

#Present address: ETH Zürich, Institute for Biomechanics, and University of Zürich, Balgrist university Hospital, Zürich, Switzerland.

Final, author-corrected PDF published online: 5 June 2013.



**Fig. 1. Corrosion casts of the seminiferous tubules network.** (A) Scanning electron micrograph of the seminiferous tubules of a murine testis filled with a polymerizable resin. For better observation tissues have been chemically digested and removed. (B) At higher magnification imprints left by the cells on the surface of the resin can be seen. Scale bars represent 250  $\mu\text{m}$  in (A) and 25  $\mu\text{m}$  in (B). For more details we refer the reader to Silván & Arechaga, 2012.

ingly enough, it has been shown that the normal function of aged SC niches can be recovered when they are exposed to systemic factors from young individuals (Conboy *et al.*, 2005); this points to the manipulation of SC niches as a potential therapeutic strategy for diseases associated with SC dysfunction.

Among the identified niches, the one corresponding to spermatogonia results especially interesting since spermatogenesis is indispensable for the persistence of species and any disturbance of SSC microenvironment can lead to the loss or reduction of fertility (Oatley and Brinster, 2008). Moreover, SSC niche could play a central role in the development of some testicular germ cell tumors (TGCTs), whose origin has been proposed to be the differentiation arrest in male primordial germ cells (PGCs), the precursors of the male germ line, during fetal development (Hoei-Hansen *et al.*, 2005).

Germ cell tumors represent about 95% of testicular neoplasias and their rate of occurrence has suffered a significant increase in the last 50 years; nowadays this type of cancer is even the most common malignancy among young men. Human germ cell tumors can be arranged in five main groups on the basis of their embryological origin and histology, according to the useful classification of Oosterhuis and Looijenga (2005). Type I GCTs are represented by the *teratomas* and *yolk-sac carcinomas*, which appear at the gonads and the midline body regions of neonates and infants. Type II TGCTs includes testicular seminomatous and non-seminomatous, which are characteristic of middle age adults or young men respectively. Type III GCTs are the *spermatocytic seminomas*, found mainly in elderly men. Type IV GCTs are the *ovarian dermoid cysts*. Finally, Type V the *hydatidiform mole* of the uterus that may lead to a choriocarcinoma. The *Type II GC seminomatous tumors* are poorly invasive and present a homogeneous histology with the presence of gonocyte-like cells whereas the *Type II GC non-seminomatous tumors*, on the contrary, show a much more aggressive phenotype with a heterogeneous histology, where a wide variety of differentiated tissues can be found, mixed with the cancer SC population known as embryonal carcinoma (EC). These EC cells express a pattern of pluripotency markers similar to that of the embryonic stem (ES) cells. Interestingly, it has been established that Type II TGCTs derive from the so-called *carcinoma in situ* (CIS) of the testis, a cell type that shares many features with ES cells. These particular cells, larger than normal

spermatogonia and with big glycogen vacuoles are usually located in a single row underlying the basement membrane of seminiferous tubules. The CIS cells are thought to develop during development directly from PGCs that have suffered an impaired differentiation and stay arrested and quiescent in the seminiferous tubuli until puberty, when they start to proliferate and give rise to any of the type II TGCTs (Rajpert-De Meyts, 2006).

The SSC niche is located in the basal layer of the seminiferous epithelium and is composed mainly by Sertoli cells and a basal lamina covered by the so-called peritubular myoid (PM) cells (Fig. 1). Leydig cells, a few stroma cells of mesenchymal origin, a soft extracellular matrix and lymphatic and blood capillaries occupy the interstitial space among seminiferous tubules (Figs. 2 and 3). All these components contribute together to create the SSC microenvironment, which regulates many aspects of stem cell functions, such as self-renewal, differentiation and apoptosis (Oatley and Brinster, 2012).

SSC self-renewal is necessary to maintain a stem cell pool with the ability to produce differentiating spermatogonia and the balance between self-renewal and differentiation has to be finely regulated to sustain spermatogenesis at optimal levels. Research on the SSC niche in mouse models has shed light on the growth factors that regulate SSC fate and testicular cell types that secrete them. Moreover, SSCs express adhesion molecules that mediate their response to the microenvironment and regulate stem cell homing to the niche. Some of the TGCT microenvironment characteristics, such as changes in the ECM or apoptosis-related growth factors, have been already described and could give a clue about the alterations of the SSC that might be involved in TGCT origin or progression (Díez-Torre *et al.*, 2010; Timmer *et al.*, 1994). Moreover, several risk factors have been identified in relation with TGCT development, such as undescended testis, contralateral testicular GCT, familial testis cancer or environmental toxics but, so far, the way these factors affect the function of the SSC niche, and thus the testicular homeostasis, is still unknown. Given that Type II TGCTs arise from abnormal SSC (CIS cells) and the importance of the SSC niche in regulating the normal or pathological behavior of these cells, this review will address the current knowledge about SSC microenvironment, its role in TGCT development and its suitability as a potential therapeutic target.

## Growth factors

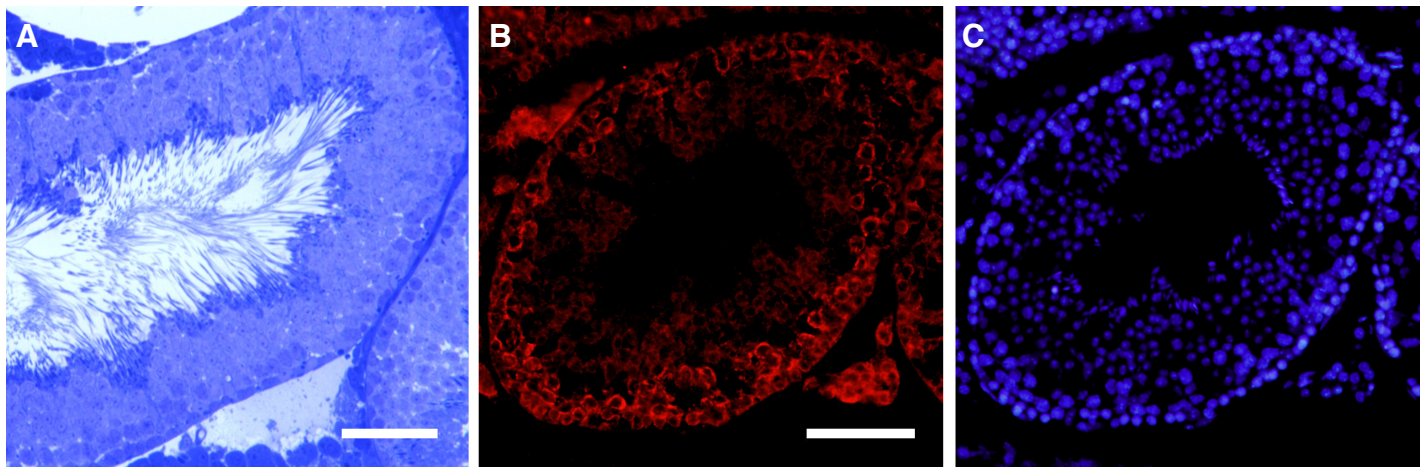
Research on SSC niche has revealed that virtually all the somatic cell populations of mammalian testes participate at some level in the biology of SSC microenvironment and, subsequently, in regulation of SSC fate, by means of self-renewal or differentiation signals. Among testicular somatic cells, Sertoli cells are the only somatic cell type found inside the seminiferous tubules and those that maintain the closest relationship with the germ line. For this reason, these cells might be the key regulators of the SSC niche. In fact, Sertoli cells have been identified as the main source of two growth factors that play a critical role in the regulation of spermatogonia self-renewal, these are the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and the fibroblast growth factor 2 (FGF2) (Mullaney and Skinner, 1992; Tadokoro *et al.*, 2002). In the last decades, SSC isolation, culture and transplantation techniques allowed the characterization of these factors in the establishment of the SSC niche.

The search for the more suitable conditions for SSC culture *in vitro* demonstrated that GDNF plays an essential role in maintaining SSC self-renewal. It has been shown that supplementation with GDNF favors survival of SSC *in vitro*, resulting in an increase of the number of cells with the ability of re-establishing spermatogenesis after transplantation (Nagano *et al.*, 2003). Moreover, it has been reported that the presence of GDNF is absolutely necessary for long-term maintenance *in vitro* of SSCs from different species. Interestingly, in many cases GDNF is not enough to maintain long-term SSC self-renewal *in vitro* and a second growth factor is needed, such as FGF-2 or epithelial growth factor (EGF) (Kubota *et al.*, 2004). Nevertheless, even though FGF2 and EGF induce proliferation of SSCs in the presence of GDNF, they are not specific for self-renewal. Indeed, they promote both expansion of SSC number and production of non-stem cell progenitor spermatogonia *in vitro* (Lee *et al.*, 2007). Moreover, GDNF seems to induce survival and proliferation in several types of undifferentiated spermatogonia and not only in SSCs. In fact, the GDNF receptor complex, constituted by c-RET and GDNF family receptor 1 (GFR1) has been

localized in different spermatogonia subtypes depending on the developmental stage of the testis (Suzuki *et al.*, 2009). Thus, the specific regulation of SSC fate after division might be achieved by another unknown growth factor.

The research on SSC niche has provided a huge body of evidence to support the role of GDNF in maintaining the testis homeostasis *in vivo*. It has been reported that GDNF deficient mice suffer fertility problems, with absence of germ cells in most of the seminiferous tubules. In contrast, mutant mice over-expressing GDNF showed an accumulation of undifferentiated spermatogonia and a high incidence of germ cell tumors that mimic human seminomas (Meng *et al.*, 2000). This result suggests that GDNF deregulation could be involved in the origin of TGCTs. In fact, GFR1 over-expression has been recently reported in CIS cells and in both intratubular and invasive seminomas in humans. In addition, it has been also demonstrated that GDNF enhances motility and invasive behavior of seminoma cells *in vitro* (Ferranti *et al.*, 2012). Interestingly enough, the other co-receptor of GDNF, c-RET, seems to remain unaltered in TGCTs, since overexpression or mutations in these genes have not been detected (Ferranti *et al.*, 2012). The relation of GDNF over-expression with carcinoma cell migration and invasion had been previously described in several tumor types, such as gliomas (Wan and Too, 2010), pancreatic cancer (Cavel *et al.*, 2012), chondrosarcoma (Su *et al.*, 2009), and colorectal cancer (Furuta *et al.*, 2007).

Analysis of the gene expression profiles of murine undifferentiated spermatogonia have shown a high expression of the gene for the colony stimulating factor 1 receptor (Csf1r), what points to its ligand, CSF-1, as an important regulator of spermatogonial progenitor self-renewal (Oatley *et al.*, 2009). Interestingly, when CSF-1 is added to cultures of mouse undifferentiated spermatogonia supplemented with GDNF and FGF2, the efficiency of the re-establishment of spermatogenesis after transplantation is significantly increased, indicating a better conservation of SSC features in culture (Oatley *et al.*, 2009). Given that this result is not related with an augmentation of spermatogonia proliferation, it can be concluded that CSF-1 acts specifically on SSCs and that



**Fig. 2. The spermatogonia stem cell niche.** (A) In an ultrathin section of a murine seminiferous tubule stained with Toluidine blue, the cells that conform the germinal epithelium can be seen, particularly germ cells at different stages of differentiation, and Sertoli cells. In the lumen of the seminiferous tubule, the tails of the differentiated spermatozoa can be observed. (B) Immunofluorescence using an anti-cKit primary antibody reveals the existence of this membrane receptor in spermatogonia (basal region of the epithelium) and in Leydig cells, with its presence in more differentiated germ cells being dramatically reduced. (C) DAPI staining. Scale bars represent 25  $\mu\text{m}$  in (A) and 40  $\mu\text{m}$  in (B,C).

its effect is due to the predominance of self-renewal signals over those that lead to the production of other spermatogonia progenitors. Thus, CSF-1 has been the first identified specific regulator of self-renewal in the SSC niche and, despite of its important role in the regulation of the SSC function, the relation of this factor with the TGCTs has not been analyzed yet. Nevertheless, its activity as regulator of tumor-associated macrophages motility has been found to promote tumor malignancy in other tumor types, including glioblastoma (Coniglio *et al.*, 2012) and pancreatic cancer (Pyonteck *et al.*, 2012). The expression of CSF-1 in the testis is localized to the interstitial space between seminiferous tubules, being secreted by Leydig cells and PM cells but not Sertoli cells (Oatley *et al.*, 2009). The fact that cell populations placed out of the physical limits of seminiferous tubules participate in the regulation of the SSC functions could be unexpected, since they do not have a direct contact with the germ cells. Yet, a number of studies have established that spermatogenesis is regulated through a cross-communication between Sertoli and Leydig cells. Thus, Leydig and myoid cells could participate in the creation of the SSC niche through their interaction with Sertoli cells.

A recent study suggests that the participation of peritubular myoid cells to the SSC niche could be independent of Sertoli cells, since they also secrete GDNF in human testis (Spinnler *et al.*, 2010). Until few years ago, the PM cell function was thought to be limited to the contractile activity that drives spermatozoa towards the *rete testis*, but recent observations have shown that these cells are also directly involved in male gonad development and maintenance of spermatogenesis (Schell *et al.*, 2008). Furthermore, their localization in the proximity of the CIS cells and its mentioned function as regulators of the SSC niche suggest that PM cells could play a key role in the origin and progression of TGCTs, probably as part of the tumor reactive stroma in response to CIS-derived signals (Díez-Torre *et al.*, 2011). Among the secretory products of PM cells, several growth factors have been identified, including nerve growth factor (NGF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and inflammatory interleukins, such as IL-6 (Schell *et al.*, 2008). The secretory activity of PM cells is complexly regulated by other components of the testicular microenvironment. Thus, alterations of this microenvironment, such as those originated by cancer cell-derived factors, may lead to phenotypic changes in PM cells that contribute to tumor growth, invasion and metastasis. A similar effect has been described for the reactive stroma of other tumors, where tumor-associated myofibroblast, which share many phenotypic features with PM cells, play a capital role (Díez-Torre *et al.*, 2004). Indeed, some of the growth factors secreted by the PM cells are frequently over-expressed in the reactive stroma of different neoplasias and have been related with poor prognosis. MCP-1, for example, is a key mediator of acute inflammation that attracts and activates macrophages (Fujimoto *et al.*, 2009). Interestingly, it has been reported that macrophage infiltration correlates with angiogenesis and poor prognosis in breast carcinoma and that the treatment of mice bearing human breast cancer xenografts with MCP-1 neutralizing antibodies resulted in a significant reduction of macrophage recruitment, together with inhibited angiogenesis and tumor growth (Fujimoto *et al.*, 2009). It is worth to mention that the removal of macrophages in mice by a homozygous null mutation of the gene that encodes CSF-1, a key regulator of SSC self-renewal that is also involved in the macrophage function, leads to a significant reduction of tumor growth rate and metastasis in

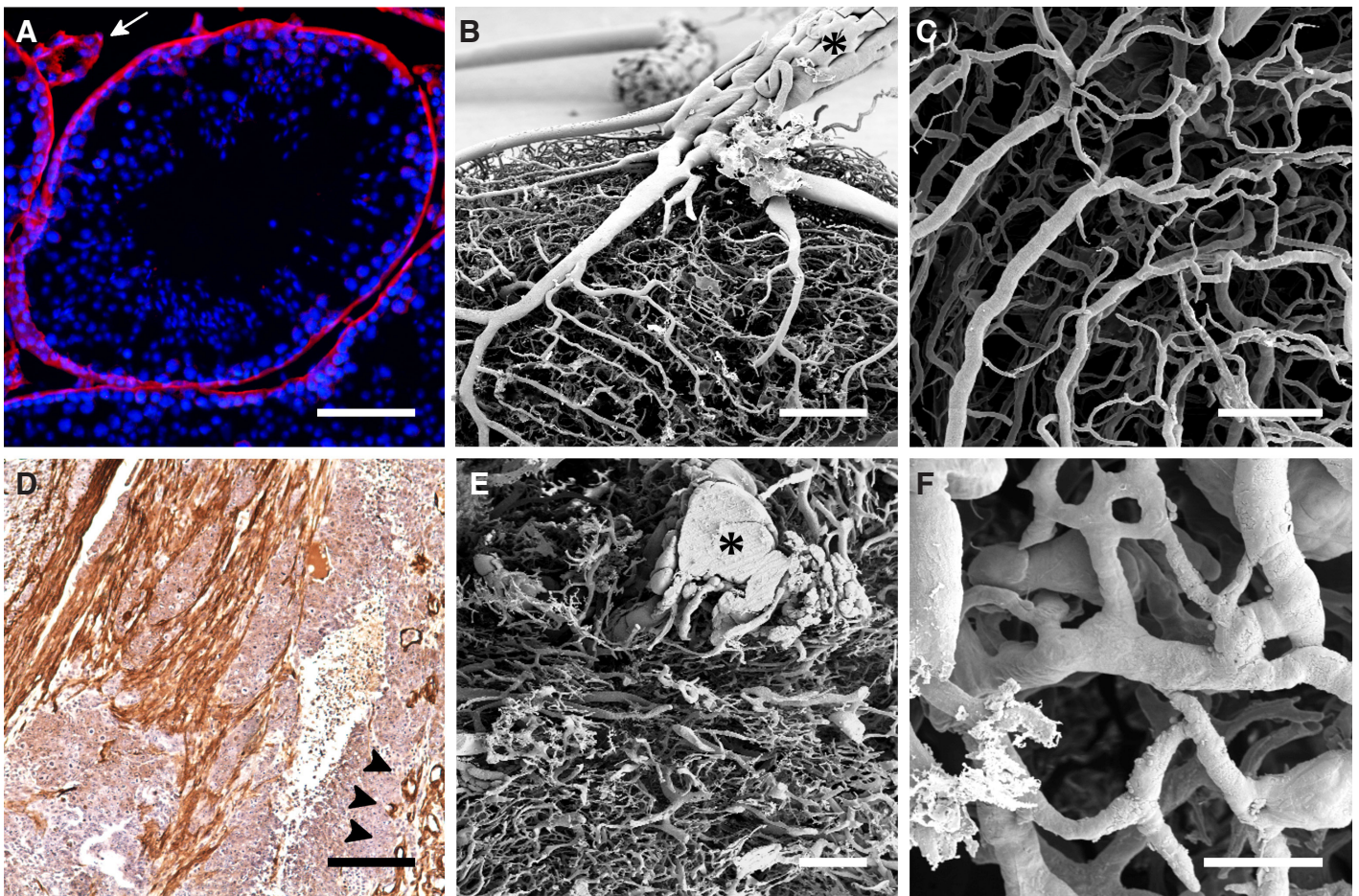
these animals (Condeelis and Pollard, 2006).

Together with GDNF and CSF-1, several studies have reported that leukemia inhibitory factor (LIF) and insulin-like growth factor I (IGF-I) could be also involved in the regulation of SSC survival and self-renewal (Kubota *et al.*, 2004; Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2007; Fig. 3). It has been observed, for example, that the supplementation of cultures of undifferentiated spermatogonia with IGF-I, GDNF and FGF2 produces a threefold increase in the SSC content with respect to IGF-I free cultures (Kubota *et al.*, 2004). However, it is still unclear if the effect of IGF-I is specific to SSCs or affects to the rest of undifferentiated spermatogonia subtypes. In human testis, IGF-I is secreted by most cells, including Sertoli cells, but also by Leydig, PM cells and some germ cells (Vannelli *et al.*, 1988). This factor has been reported to be involved in the development of the embryonic mouse testis, in the regulation of testosterone production, and in spermatogenesis (Froment *et al.*, 2007). Interestingly, IGF-I has also been identified as a key regulator of the SDF-1/CXCR4 signalling pathway, whose function is necessary for the proper migration of PGC (Schlueter *et al.*, 2007) and has been associated with the metastatic pattern of several carcinomas, including TGCTs. Indeed, TGCTs exhibit an outstanding conserved pattern of metastases to organs that express high levels of SDF-1, such as lymph nodes, lungs and bone; resembling patterns observed in other CXCR4 over-expressing cancers. Previous studies on the expression pattern of IGF system members have shown that IGF-I and IGFBP-5 are highly expressed in CIS cells and that this co-expression could be related with the transition from CIS to intratubular TGCTs by means of a proliferative effect (Drescher *et al.*, 1997). IGF-I signaling has been also related with the repression of differentiation-related genes. In fact, Leydig cell-derived IGF-I mediates the maintenance of spermatogonial stem cell pluripotency and confers on them a PGC-like phenotype through PI3K pathway (Huang *et al.*, 2009). Moreover, IGF-I signaling mediates the up-regulation of MMP-2 and MT1-MMP, two proteases involved in matrix degradation and directional cell migration that are usually involved in the formation of metastases.

Taken all the mentioned findings together, it becomes clear that changes in the growth factor combination that constitute the SSC niche could be involved in the origin of TGCTs or contribute to the transition from testis CIS to invasive germ cell tumors. Thus, the re-establishment of the balance between self-renewal, proliferation and differentiation signals in the spermatogonial microenvironment could be a useful approach in the search for new therapies against these malignancies.

### Cell adhesion molecules

Cells adhesion molecules (CAMs) are a large group of membrane proteins that belong to different families, including cadherins, integrins, selectins, and members of the immunoglobulin superfamily. These proteins, which can be classified into two large categories, cell-matrix and cell-cell adhesion proteins, participate in the structural organization of tissues and in the signal transduction into the cell. In the seminiferous epithelium and interstitial tissue of the testis, adhesion molecules have been reported to play a role in differentiation and self-renewal of the spermatogonial stem cells. In addition, their implication in processes such as adhesion, migration, invasion, growth, proliferation and apoptosis in cancer has received increased attention during the last years (Wong *et al.*



**Fig. 3. Peritubular myoid (PM) cells / myofibroblasts and vascularization of the murine testis and of experimental TGCTs after ES cell transplantation into the seminiferous tubules. (A)** Smooth muscle actin expression (in red) is restricted to the peritubular myoid cells and to the smooth muscle cells surrounding blood vessels (arrow); DAPI nuclear staining (blue). **(B)** Corrosion casting of the vascular system in the murine testis reveals the blood supply of the testis (asterisk). The arterial blood penetrates the testis surrounded by the spermatic veins (pampiniform plexus) to cool it. **(C)** At higher magnification, the regular organization of the testicular capillaries, that run parallel to the seminiferous tubules, can be seen. **(D)** Experimental TGCT myofibroblasts expressing  $\alpha$ -actin and forming thick layers that enclose nests of tumor cells. Extensive angiogenic capillaries can also be recognized (arrowheads). **(E)** In the same tumors, the regular vessel architecture of the testis is completely lost in a tangle of irregular neocapillaries, as observed in this vascular corrosion cast. However, bigger sized vessel can still be recognized (asterisk). **(F)** Higher magnification imaging reveals the pathological morphology of tumor vessels, with irregular sizes and frequent blind-endings, architectures incompatible with the efficient blood flow and oxygenation of the tissues. Scale bars represent 40  $\mu$ m (A); 600  $\mu$ m (B,E); 200  $\mu$ m (C,D) and 100  $\mu$ m (F).

*et al.*, 2012).

The integrin family is composed by  $\alpha$ - and  $\beta$ - subunits that combine into a large number of alternative dimers. At least 24 different of them have been described so far. The subunit composition of the dimers dictates their properties and functions in the integrity of the tissues through cell-cell contacts and binding of the cell to the ECM. Integrins are also involved in cell signaling related with cell death, proliferation and migration in processes such as embryonic development, homeostasis and immune response (Clifford *et al.*, 2012).

Analysis of the expression pattern of integrins in testis containing intratubular germ cell neoplasias revealed an increased expression of  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 6, and  $\beta$ 1 integrin subunits in Sertoli cells, but also in malignant cells. However, progression to invasive seminoma was found associated with loss of  $\alpha$ 3 integrin subunit expression by tumor cells (Timmer *et al.*, 1994). Histological analysis of teratomas induced by normal and  $\beta$ 1-null ES cells has revealed a role of this

subunit in tumor vascularization. Besides significant smaller size, tumors lacking  $\beta$ 1 integrin showed impaired vascularization (Bloch *et al.*, 1997). Similarly, teratocarcinomas derived from  $\alpha$ 5-null ES cells showed decreased vessel area, being however, some of the injected cells able to differentiate into endothelial cells (Taverna and Hynes, 2001). Since tumors derived from  $\beta$ 1-null ES cells contained significantly lower number of host derived stromal cells, it is likely that this integrin is related with the vasculogenic process from host-derived endothelial precursors. However, a second vasculogenic mechanism in which transplanted ES cells differentiate into endothelial cells is as well possible (Silván *et al.*, 2009b), even in the  $\alpha$ 5-null tumors (Taverna and Hynes, 2001). In fact, the  $\alpha$ 5 subunit has been reported to participate in the remodelling of the embryonic vascular system in a process that might resemble TGCT vascularization.

In other tumor types, the heterodimer formed by the  $\alpha$ 5 with the  $\beta$ 1 integrin subunits appears down-regulated. For example,

in prostate cancer cells, reduced expression of  $\alpha 5\beta 1$  causes the disruption of matrix assemblage and, thus, facilitates cell detachment and subsequent invasion (Jia *et al.*, 2012). Although the loss of cell-cell and cell-matrix contacts is necessary for the tumor cells to metastasize, the integrin expression pattern as well dictates their extravasation at specific sites. For example, cancer cells of prostatic origin express functional  $\alpha V\beta 3$  integrin, that binds to several ECM components present in bone tissues, including fibronectin, vitronectin, and osteopontin. Therefore, these tumor cells frequently form distant metastasis in these places (McCabe *et al.*, 2007).

Experiments in which SSCs were transplanted into the seminiferous tubules of mice revealed the importance of these CAMs, particularly integrin  $\beta 1$ , in the spermatogonial cell homing process (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008). In these series of experiments spermatogonial cells isolated from  $\beta 1$ -integrin knockout animals were transplanted into wild type mice. Spermatogenesis and colonization of the niche by SSCs were analyzed at different periods of time and the results showed that cells lacking  $\beta 1$ -integrin had a significantly reduced colonization capacity (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008). Similarly, transplantation of spermatogonia into seminiferous tubules with  $\beta 1$ -integrin-deficient Sertoli cells showed as well impaired colonization, suggesting that these type of contacts might regulate germ cell movement during passage through the blood testis barrier.

As previously mentioned, PM cells constitute, together with the basement membrane, a physical barrier that provides structural support of the seminiferous tubules. In the last decades, it has been proven that PM cells regulate testicular homeostasis during testicular development and spermatogenesis (Mackay and Smith, 2007) being as well responsible for the formation of the basement membrane through the secretion of some of its main components together with other ECM proteins, such as fibronectin, laminin, collagens I, IV and XVIII, proteoglycans, entactin and osteonectin (also known as secreted protein acidic and rich in cysteine or SPARC) (Schell *et al.*, 2008). In TGCTs, the basement membrane constitutes a physical barrier that prevents carcinoma cells to invade the stroma. Thus, deregulation of the secretory activity of PM cells might produce changes in the basement membrane composition that could be translated into less consistency and pro-migratory signals that would favor the progression from CIS to invasive TGCTs (Timmer *et al.*, 1994). Platelet derived growth factor (PDGF) has been related with the origin and progression of TGCTs due to its role in angiogenesis and spermatogenesis, but more recently, its effect on PM cells has also been described, including stimulation of proliferation and the secretion of ECM proteins (Basciani *et al.*, 2002).

PM cells are as well a source of pro-invasive factors associated with cell growth, differentiation, survival and migration to the reactive stroma in TGCTs. The secretory activity of this type of cell is complexly regulated by other components of the testicular micro-environment and the progression of intratubular germ cell tumors may cause changes in this secretory activity that could result in loss integrity of the basement membrane, which contribute to the tumor growth, invasion and metastasis of TGCTs (Díez-Torre *et al.*, 2011). This disruption may result as well in changes of CAMs expression pattern and subsequently, in structural and functional disorders. Magnanti and colleagues (2001) examined the expression pattern and the role for integrins in the contraction activity of human and rat PMs. They showed that human PM cells express

$\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  and  $\beta 4$  integrin subunits and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and described in particular the role of  $\beta 1$  integrin in cell contraction. Their results suggest that abnormal integrin pattern may promote alteration in the contractile activity, which may contribute to spermatogenic defect.

Concerning cell-cell adhesion, cadherin molecules are particularly interesting. The assembly and regulation of cohesive intercellular junctions is central to morphogenesis and tissue homeostasis, and calcium-dependent, transmembrane classical cadherins are the major architectural proteins at intercellular junctions (Leckband and Sivasankar, 2012). The adhesion mediated by these molecules is generally homophilic (cadherin-cadherin) and homotypic (between the same cell types), even though there are exceptions. Among the classic cadherin subfamily, the roles of E-cadherin, N-cadherin and VE-cadherin have been mostly studied in human pluripotent stem cells. These three classical cadherins were originally named for the tissue in which they were prominently expressed: epithelial cadherin (E-cadherin) in skin epithelia, neural cadherin (N-cadherin) in the central nervous system and vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) in blood vessel endothelia.

Interesting enough E-cadherin and other cell adhesion molecules play a key role in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. Recent studies of the mouse germline showed that expression of E-cadherin is localized to undifferentiated spermatogonia in the mouse testis including As, Apr, and Aal subtypes (Nakagawa *et al.*, 2010). In cancer, a switch from E-cadherin to N-cadherin expression leads to the epithelial-to-mesenchymal (EMT) transition and it is has been observed in hESC differentiation. Besides, loss of E-cadherin, a key component of adhesion junctions, is characteristic of EMT and it is associated with tumor cell invasion (Le Bras *et al.*, 2012).

Regarding the neuronal cadherin, N-cadherin (CDH2), the role of this 140 kD protein in processes such as migration, differentiation, embryonic development and metastatic behavior of tumor cells has been reported. The analysis of the expression of cadherins in several stem cell types has demonstrated that, whereas ES cells only express E-cadherin, some teratocarcinoma-derived EC cell lines express both E- and N-cadherin on their surface (Díez-Torre *et al.*, 2004). In our laboratory, we have studied the function of E-cadherin in different ES and EC cell lines by aggregation assays in the presence and absence of specific anti-E-cadherin antibodies. We observed that all the analyzed cell lines were able to aggregate in the absence of antibodies. Nevertheless, the aggregation capacity of the PGC-derived EG-1 cell line and the ES cell line AB1 was totally abrogated by blocking E-cadherin, whereas this treatment did not significantly alter the aggregation ability of the two murine EC cell lines F9 and P19. These results indicate that at least in these cells, E-cadherin may not be essential for the aggregation process (Díez-Torre *et al.*, 2004).

Recently, it has been found that down-regulation of N-cadherin in malignant glioma results in cell polarization defects leading to abnormal motile behavior with increased cell speed and decreased persistence in directionality. Nevertheless, the role of cadherins in the development of cancer in non-epithelial tissues is still debated. This could be the case of TGCTs in which the aggressive embryonal carcinomas and chorionic carcinomas expression of N-cadherin cannot be detected (Bremmer *et al.*, 2012), unlike in the intratubular germ cell neoplasias, seminomas, teratomas and yolk sac tumors.

Along with cadherins, the expression of dysadherin has been reported in testicular tumors. Dysadherin is a recently described cell membrane glycoprotein, which has an anti cell-cell adhesion function and down-regulates E-cadherin. Dysadherin is not expressed in non-neoplastic germ cells, neither in CIS or intratubular germ cell neoplasia, but it is highly expressed in all types of germ cell tumors. Since dysadherin is not normally expressed in non-neoplastic testis, it is conceivable that it plays a role in the neoplastic transformation of germ cells (Batistatou *et al.*, 2005).

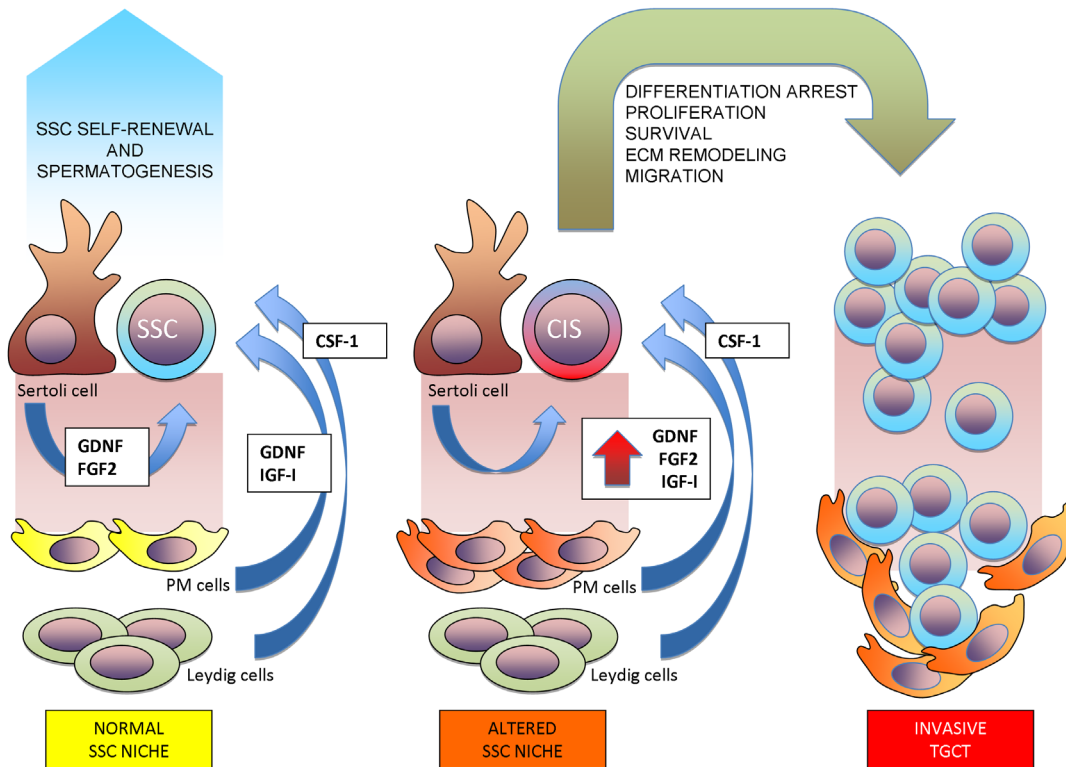
### Vascularization and hypoxia

The blood vasculature of the testis conforms a highly organized system according to a pattern that is well conserved among mammals (Lupiañez *et al.*, 2012). Two distinct orientation of vessels are found: those that run longitudinally, parallel to the seminiferous tubules, and the transverse ones, that surround the tubules and connect the longitudinal ones every 100 to 200  $\mu\text{m}$  (Silván *et al.*, 2010 and Fig. 4). The term 'vascular niche' is used to refer to the microenvironment characterized by the presence of angiocrine factors and the ECM secreted by endothelial cells, which promotes the survival and proliferation of normal and malignant stem cells. Therefore, a close proximity of stem and endothelial cells to the blood capillaries is assumed. However, in the particular case of the mammalian testis, spermatogonia are separated from the blood vessels by a basal lamina and the SSC niche would therefore not strictly comply with the above assumption. Nevertheless, spermatogonia are not randomly spread along the seminiferous tubules and have a precise localization in the proximity of blood capillaries.

Using fluorescently labeled spermatogonia it was shown that the undifferentiated germ cells were preferentially found in portions of the basal compartment adjacent to blood vessels and particularly close to vessel branching points (Yoshida *et al.*, 2007). Sertoli cells control another possible regulation of the oxygen concentration in the SSC niche. It is known that this cell type secretes Endothelin-1, a strong vasoconstrictor. Thus, by enhancing the secretion of this factor, the blood flow, and subsequently the oxygenation of the tissue, can be reduced. Considering that the Endothelin-1 receptors are variably expressed by the different germ cells (Maggi *et al.*, 1995) it would be interesting to evaluate the availability of Endothelin-1 in the different stages of spermatogonial differentiation and determine which ones are associated with smooth muscle contraction.

As in most tumors, TGCTs vessel density is significantly increased in comparison to the normal tissue, however, the vascular architecture present in the testis is dramatically remodeled and transformed into a disorganized network with the characteristics of an immature vascular system (Silván *et al.*, 2010). In experimental TGCTs generated by the transplantation of ES cells into the seminiferous tubules, the tumor vessels show irregular shapes, frequent compressions and blind endings (Silván *et al.*, 2009a and Fig. 3). This chaotic vascular architecture results in defective oxygenation of the tumor tissue and hypoxic regions.

Cellular adaptation to hypoxia is mediated by the Hypoxia Inducible Factors (HIFs), being HIF-1 the best-characterized member of the family. This transcription factor is a heterodimer composed of a constitutively expressed  $\beta$ -subunit and an oxygen-regulated  $\alpha$ -subunit. In healthy tissues, functions of HIF-1 include the promotion



**Fig. 4. The spermatogonial stem cell (SSC) niche and its potential implication in testicular germ cell tumor (TGCT) progression.**

Sertoli cells are key regulators of the microenvironment of the SSC niche, being the main source of the growth factors GDNF and FGF2, which regulate SSC proliferation and survival. Leydig cells secrete CSF-1, a specific regulator of SSC self-renewal. In humans, peritubular myoid cells have been reported to be a secondary source of GDNF and other growth factors that influence SSC proliferation and self-renewal, including IGF-I. In the presence of CIS of the testis, peritubular cells might respond to CIS-derived factors, including PDGF and TGF- $\beta$ , increasing their proliferation and secretory activity. This could lead to the alteration of the SSC niche and increased expression of some of its determinants. Over-expression

of GDNF has been related with TGCT development through the induction of differentiation arrest, proliferation and survival. IGF-I has been identified as an inducer of proteolytic enzymes that take part in remodeling of the extracellular matrix and as a key regulator of pro-migratory signals, such as the SDF-1/CXCR4 axis. Thus, any or all of these alterations of testis homeostasis could contribute to the development of invasive TGCTs.



of vascularization and the coordination of the shift of the cells to anaerobic metabolism. In addition, it is known that reduced oxygenation levels can promote the undifferentiated state of many stem cell populations, including embryonic, hematopoietic, and neural stem cells among others. The role of hypoxia in the induction and maintenance of the pluripotent CSC phenotype has been proved as well in a number of different tumor types. However, in certain tumor types, an accumulation of CSCs in the proximity of vessels has been reported. Although this observation apparently opposes previous results, *in vitro* co-culture experiments have shown that endothelial cells secrete paracrine factors that promote CSC growth and stemness. Hence, endothelial cells might fulfill, besides their vascular role, other functions in the tumor tissue. In addition to the maintenance of stem cell characteristics, hypoxia alters the Notch1 signaling pathway and subsequently increases CSC proliferation and apoptosis resistance in other types of cancer. Furthermore, overlapping of pathways regulated by HIF and some oncogene signaling pathways, such as cMyc and p53, has been as well suggested as possible tumor promoting mechanism (Mazumdar *et al.*, 2009). Regarding TGCTs, *in vitro* experiments in which ES and EC cell lines were cultured under hypoxic conditions, revealed that low oxygenation promoted faster proliferation, independently of the presence of LIF in the culture medium. In addition, expression of vasculogenic factors and endothelial markers, such as Placental-like Growth Factor (PLGF) or VEGF-A, together with endothelial cell markers was as well observed under low oxygenation cultures of ES cell lines (Silván *et al.*, 2009b).

Expression of factors that promote vascularization has been described in a number of CSCs. In turn, experimental TGCTs show increased expression of factors related with vasculogenesis, such as VEGF-A and C, the VEGF receptors 1, 2 and 3, and PECAM-1 (Silván *et al.*, 2010). Thus, it is possible that the undifferentiated cell population present in TGCTs takes advantage of the impaired blood supply and proliferates faster, originating, depending on the presence of additional growth factors, endothelial cells. In fact, transplantation of ES cells into the seminiferous tubules revealed their differentiation into endothelial cells that form part of the neoplastic vascular system (Silván *et al.*, 2009a). Since the undifferentiated cell population of TGCTs has a differentiation potential comparable to that of ES cells (Aréchaga, 1993), it is likely that part of the vessels in spontaneous TGCTs as well arise from neoplastic cells. However, considering that EC cells cultured under hypoxic conditions did not express endothelial cell markers, it is feasible that this differentiation process requires additional factors (Silván *et al.*, 2009b). Taken together, these characteristics result in the formation of a highly permeable vascular network, as revealed by the frequent extravasations of the injected resin in vascular corrosion casts (Silván *et al.*, 2009a and Fig. 3). The leakiness of the vessels facilitates invasive tumor cells to enter the blood circulation and metastasize. Although most TGCTs and their metastases respond to chemotherapy, some patients with spread tumors are resistant to treatment. Remarkably, clinical studies establish a relationship between hypoxia and poor clinical outcome caused by increased metastasis and invasive potential (Vaupel, 2008).

During the last decades, a number of therapeutic targets have been proposed in order to control vasculogenesis and its consequences in cancer. Despite the efficacy of some of them in murine cancer models, the results of clinical trials in which anti-angiogenic agents were used together with chemotherapy have been disap-

pointing (Kerbel, 2008). Since testicular cancer shows a high rate of metastasis, it represents a unique model to study this process. Furthermore, a better understanding of the vascularization process and its implications in TGCTs is needed to develop new tools to combat tumor progression and to reduce the mortality associated with resistant and recurrent TGCT metastases. A better knowledge of the vasculogenic process in the testis would further improve the delivery of drugs to target sites in this and other malignancies.

### **Mechanical stress and cytoskeletal organization in the spermatogonial niche and tumors**

The study of the mechanical microenvironment, as a player in normal stem cell differentiation and cancer has obtained increased attention during the last years. Although the role of the different mechanical features of the testicular tissue has never been precisely analyzed for the establishment of the SSC niche or in development of TGCTs, insights gained from other organs can throw some light on their importance. For example, using a 3D tubule system subjected to propel fluid flow, a situation that to certain extent reminds the seminiferous tubules, Huang and colleagues (2005) observed a differential fate of the seeded ES Flk+ cells depending on their location in this artificial system. While those cells on the luminal region expressed PECAM, and exhibited an endothelial phenotype, the cells found in the interstices among the artificial tubules expressed smooth muscle actin (SMA) and, therefore, reminded to the muscle cells surrounding the vessels (Huang *et al.*, 2005). Similarly, shear stress applied to murine mesenchymal progenitor cells has shown to affect their morphology and enhance endothelial surface markers (Wang *et al.*, 2005). In contrast, a variation on the stress parameters induces the differentiation of murine Flk+ ES cells into HSCs after a Runx1-triggered process.

Due to the similarities between CIS of the testis and ES cells, experiments in which stress is applied on the later may yield results significant for the study of testicular cancer. In a series of tests, in which magnetic twisting cytometry was used to locally apply tensile force on single murine ES cells, Chowdhury and colleagues (2010) observed a significant reduction in Oct3/4 expression, maintaining the surrounding non-stressed cells their undifferentiated state. Another mechanical characteristic crucial for stem cell differentiation is matrix stiffness. Engler and colleagues were the first to study the effect of substrates with different mechanical properties on stem cell lineage commitment. Their studies revealed that soft matrices mimic nervous tissues and are neurogenic, stronger matrices mimic muscle tissues and are myogenic, and rigid matrices are more similar to collagenous bone tissues being osteogenic (Engler *et al.*, 2006).

Extensive ECM remodeling and stiffening characterizes malignant tissues. This is in part a result of an altered metabolism of collagen, which is the most abundant scaffolding protein in the stroma. In fact, increased collagen expression, deposition, and turnover have been directly related with tumor progression (Jodele *et al.*, 2006). Although type I collagen has been considered a physical barrier that reduces tumor invasion, an increased expression of collagen is associated with elevated incidence of metastasis. It is as well known that collagen crosslinking and the resulting tissue fibrosis increase risk of malignancy (Colpaert *et al.*, 2003). Since these results apparently contradict the correlation between high expression levels of MMPs and poor prognosis in cancer patients,

it is possible that the underlying mechanism is more complex. Nevertheless, this interpretation could further explain the limited success of MMPs inhibitors in clinical trials. Another possible mechanism of stiffness regulation of malignancy involves enhanced integrin-dependent mechanotransduction.

In the testis, Sertoli cells are the only intratubular somatic cell in the seminiferous tubules and based on their proximity to undifferentiated spermatogonia, it is likely that they are directly involved in the establishment and maintenance of the adequate mechanical environment. As most mammalian cells, their cytoskeleton has three main components: actin, intermediate filaments (IFs) and microtubules (MTs). MTs are involved in maintaining the columnar shape of Sertoli cells, being however, the exact organization dependant of the developmental stage of spermatogenesis. For example, a marked increase in MTs in the cytoplasmic projections associated with round spermatids has been observed (Vogl, 1988). In general terms, like most epithelial cell types, Sertoli cells have a non-centrosomal MT organization with the MTs running along the long axis and with their minus ends oriented apically (Bartolini and Gundersen, 2006). Experiments using the MT disrupting drugs, such as colchicine, vinblastine or carbendazim resulted in a dramatic loss of Sertoli cell architecture as well as sloughing of germ cells (Correa *et al.*, 2002).

The mechanical properties of IFs, combining flexibility and elasticity, together with their attachment to desmosome-like and hemidesmosome-like junctions, point to them as key players in the maintenance of tissue integrity, particularly in epithelial tissues. In Sertoli cells IFs mainly consist of vimentin (Franke *et al.*, 1979), but keratins are expressed during testis development (Paranko *et al.*, 1986). In normal testes, stromal cells and Leydig cells are as well positive for vimentin, while the epithelium lining the *rete testis* expresses cytokeratin. Although the vimentin knockout mouse is viable and the seminiferous epithelium in these animals looks remarkably normal (Colucci-Guyon *et al.*, 1994) it is possible that in these cells IFs play a mechanical strengthening role only when the epithelium is stressed in a particular fashion or to sufficient levels. In testicular cancer, it has been reported that only a small part of the cells are positive for vimentin in seminomas (Miettinen *et al.*, 1985). In some embryonal carcinomas vimentin-positive tumor cells were also found, probably representing either Sertoli cells trapped inside the malignant tissue or attempts to further differentiation of tumor cells. In addition, only a fraction of seminomas contain cytokeratin-positive cells, some of them multinucleated. In turn, tumor cells of embryonal carcinomas, endodermal sinus tumors and choriocarcinomas display cytokeratin positivity. In immature teratomas, both the immature and the mature epithelial components express cytokeratin, while the stromal components, including cartilage, contain vimentin, and the smooth-muscle elements, desmin (Miettinen *et al.*, 1985).

PM cells might play as well an important role in the regulation of the mechanical conditions for the correct differentiation and self-renewal of spermatogonia. These cells that surround the seminiferous tubules are known to express cytoskeletal markers of smooth muscle cells ( $\alpha$ -actin) and participate in the contraction of the seminiferous tubules for the propulsion of tubular fluid and spermatozoa (Wrobel *et al.*, 1986). However, it was not until recently that the precise organization of their actin cytoskeleton has been revealed. Losinno and colleagues (2012) showed that these cells present an interconnected system of actin and myosin

filament bundles distributed in two independent layers that are perpendicular to each other. Besides the steroid regulation of the contraction of the seminiferous tubules, Sertoli cells produce Endothelin-1, a potent stimulator of smooth muscle. There exist two types of receptors for Endothelin-1 in PM cells, named ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>, being probably each type of receptor responsible for the contraction in one direction. Thus, this system, triggered as well by Sertoli cells, allows a precise mechanical regulation of the germinal epithelium and therefore may play a role in the generation of the forces needed for the correct maintenance and differentiation of the germinal stem cells.

High number of  $\alpha$ -actin expressing myofibroblasts in tumors has been associated with malignancy (Nakayama *et al.*, 1998). Interestingly, *in vitro* experiments show that mechanical stiffness drives the myofibroblastic differentiation of some liver cells (Olsen *et al.*, 2011). Since EC cells show high plasticity, part of the tumor-associated fibroblast might come from the malignant cells. In fact, in experimental TGCTs generated by transplantation of ES cells into the seminiferous tubules (Silván *et al.*, 2011), the existence of a population of  $\alpha$ -actin positive cells derived from the tumor cells was as well described (Fig. 3D; Diez-Torre *et al.*, 2011). Furthermore, mechanical stress, especially compressive strains, which could be equivalent to the high pressures caused by defective TGCT vascularization (Figs. 3E and 3F), promotes expression of smooth muscle cell-specific cytoskeletal protein in marrow stromal cells. Nevertheless, the precise role of PM cells in the establishment of the stem cell niche and in TGCTs development remains an open question. It would be therefore interesting to analyze the effect of relaxation and permanent contraction of these cells on stem cell differentiation and progression of CIS into invasive carcinoma.

## Conclusions

Understanding the microenvironment in which tissue stem cell populations are maintained becomes increasingly important. The wide knowledge of male germ cell differentiation, together with the existence of several animal mutants that show deficiencies in spermatogenesis, make SSCs a unique model for the study of the adult stem cell niche of spermatogonia and its malignant transformation. Additionally, several techniques that have been specifically developed for the functional study of testis are useful in the study of the referred microenvironment. These include transplantation of different cell types, such as somatic, embryonic, tumorigenic and germinal cells into the seminiferous tubules, and direct modification of the cells forming the germinal epithelium. However, the acquired knowledge of the different components that define the niche should be studied integrated to positively understand their significance. Furthermore, considering that many of the molecular pathways involved in stem cell maintenance are shared by the malignant cancer stem cells, some of them might represent novel targets for cancer therapy.

## Acknowledgements

This work was supported by Grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2012-39773), Basque Regional Government (IT560-10) and the SPRI/Saiotek program of the Basque Society for Industrial Restructuring and Promotion (S-OA11UN001). The authors would like to thank to Mr. Juan Luis Vidaurrazaga and Dr. David Fogarty for his editorial assistance. Pablo Moreno had a predoctoral fellowship from the Jesús de Gangoiti Barrera Foundation (Bilbao, Vizcaya, Spain).





**Further Related Reading, published previously in the *Int. J. Dev. Biol.***

**Regulation of primordial germ cell development in the mouse**

M De Felici

Int. J. Dev. Biol. (2000) 44: 575-580

**Developmental fates of the mouse germ cell line**

Y Matsui

Int. J. Dev. Biol. (1998) 42: 1037-1042

**The germ cell—the mother of all stem cells**

P J Donovan

Int. J. Dev. Biol. (1998) 42: 1043-1050

**Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis**

I Damjanov

Int. J. Dev. Biol. (1993) 37: 39-46

**Ontogeny, pathology, oncology**

V E Papaioannou

Int. J. Dev. Biol. (1993) 37: 33-37

**Extrinsic factors in cellular differentiation**

R L Gardner

Int. J. Dev. Biol. (1993) 37: 47-50

**Regulators of normal development and tumor suppression**

L Sachs

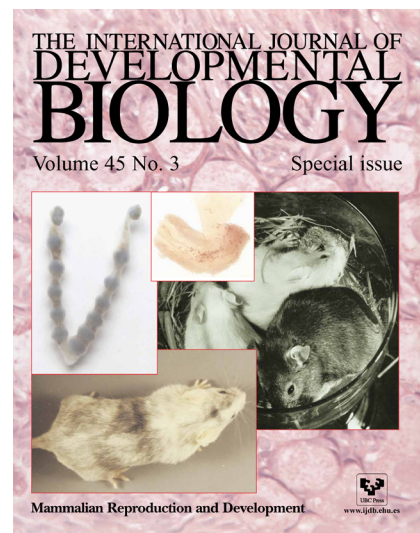
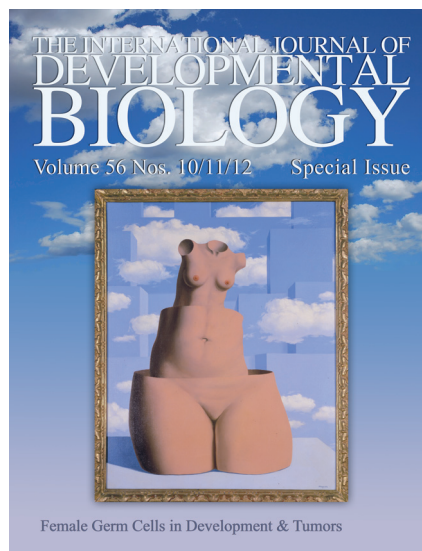
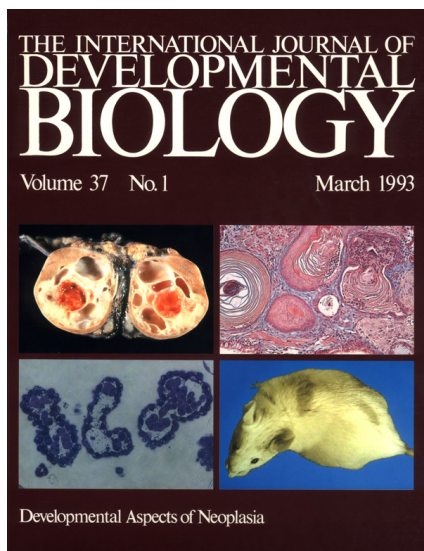
Int. J. Dev. Biol. (1993) 37: 51-59

**Understanding the roles of growth factors in carcinogenesis: modulation of autocrine growth control by differentiation**

A Rizzino

Int. J. Dev. Biol. (1993) 37: 61-65

**5 yr ISI Impact Factor (2011) = 2.959**





## Review article

# Vasculogenesis and angiogenesis in nonseminomatous testicular germ cell tumors

Unai Silván<sup>a,1</sup>, Alejandro Díez-Torre<sup>a,b</sup>, Zuriñe Bonilla<sup>a</sup>, Pablo Moreno<sup>a</sup>,  
María Díaz-Núñez<sup>a</sup>, Juan Aréchaga<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Stem Cells, Development and Cancer, Department of Cell Biology and Histology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vizcaya, Spain*

<sup>b</sup> *Analytical and High Resolution Biomedical Microscopy Core Facility, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vizcaya, Spain*

Received 4 December 2014; received in revised form 7 January 2015; accepted 8 January 2015

## Abstract

Testicular germ cell tumors (TGCTs) comprise the vast majority of all testicular malignancies and are the most common type of cancer among young male adults. The nonseminomatous variant of TGCTs is characterized by the presence of embryonic and extraembryonic tissues together with a population of pluripotent cancer stem cells, the so-called embryonal carcinoma. One of the main causes of the resistance of these tumors to therapy is their ability to invade adjacent tissues and metastasize into distant sites of the body. Both of these tumor processes are highly favored by the neovascularization of the malignant tissue. New vessels can be generated by means of angiogenesis or vasculogenesis, and both have been observed to occur during tumor vascularization. Nevertheless, the precise contribution of each process to the neoplastic vascular bed of TGCTs remains unknown. In addition, another process known as tumor-derived vasculogenesis, in which malignant cells give rise to endothelial cells, has also been reported to occur in a number of tumor types, including experimental TGCTs. The participation and cross talk of these 3 processes in tumor vascularization is of particular interest, given the embryonic origin of teratocarcinomas. Thus, in the present review, we discuss the importance of all 3 vascularization processes in the growth, invasion, and metastasis of testicular teratocarcinomas and summarize the current state of knowledge of the TGCT microenvironment and its relationship with vascularization. Finally, we discuss the importance of vascularization as a therapeutic target for this type of malignancy. © 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Testicular germ cell tumor; TGCT; Vasculogenesis; Angiogenesis; Teratocarcinoma; Teratoma; Vascularization; Tumor-derived endothelial cell

## 1. Introduction

Germ cell tumors represent approximately 20% of all neoplasms in male adolescents, being the most frequent solid tumor among young adult white men [1]. In most men, germ cell tumors are located in the testis and are consequently referred to as testicular germ cell tumors

(TGCTs). Among TGCTs, the nonseminomatous variant has the peculiarity of containing differentiated tissues together with an undifferentiated stem cell population known as embryonal carcinoma (EC) [2]. The large variety of cell types present, together with the chaotic tissue pattern displayed by teratocarcinomas, makes the study of their growth and invasion mechanisms a challenging research theme. It is now widely accepted that the carcinoma in situ (CIS) of the testis is the precursor lesion of TGCTs and that at the moment of birth, these intratubular cells are already present in the premalignant testis. Nevertheless, the origin of the CIS of the testis is still a matter of debate. Although some evidence points to primordial germ cells (PGCs) as its cause, other experiments point to more undifferentiated cells as the origin of spontaneous testicular teratocarcinomas. In fact, CIS of the testis shares many genetic and

Research grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (SAF2012-39773), the regional Basque Government Research Groups Program, Spain (T560-10), and the SAIOTEK Program (SOA11UN001) of the Basque Science, Technology and Innovation network (SPRI) to J. Aréchaga supported this work.

<sup>1</sup>Present address: ETH Zurich, Institute for Biomechanics and University of Zurich, Balgrist University Hospital, Zurich, Switzerland.

\* Corresponding author.

E-mail address: [juan.arechaga@ehu.es](mailto:juan.arechaga@ehu.es) (J. Aréchaga).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.01.005>

1078-1439/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

functional features with embryonic stem (ES) cells (ESCs), including similar gene expression patterns and differentiation potential [3].

The neovascularization process starts with the so-called angiogenic switch, defined as the up-regulation of vascularization-promoting factors and the down-regulation of its inhibitors resulting in an imbalance that favors the formation of new vessels. The neoplastic transition from the avascular phase into the vascular one results in the abolishment of the limitation to grow at distances greater than that of the effective diffusion of oxygen into the tissue. There are 2 different processes, vasculogenesis and angiogenesis, that are known to participate in the creation of the physiological vascular network [4]. Vasculogenesis consists of the de novo differentiation of bone marrow–derived endothelial progenitor cells (EPCs), named angioblasts, into endothelial cells that can incorporate into the vasculature. In turn, in the angiogenic process, vessels grow from pre-existing ones via 2 distinct mechanisms: sprouting and intussusceptive angiogenesis. The latter consists of the insertion of interstitial cellular columns into the lumen of pre-existing vessels. The growth and structural stabilization of these cell masses results in the division of the vessel and subsequent vascular reorganization. In sprouting angiogenesis, the endothelial cells forming the capillary walls secrete proteases that degrade the surrounding basal membrane, and subsequently, invade the adjacent tissue and proliferate to give rise to new vessels.

In tumors, 2 more mechanisms for the formation of vascular structures (in addition to angiogenesis and “conventional” vasculogenesis) have been reported to date. The first one, “neoplastic” vasculogenesis, involves the generation of endothelial cells derived from tumor cells (i.e., tumor-derived endothelial cells or TECs); this process has been reported to occur in a number of tumor types. The second process, the so-called “vascular mimicry,” consists in the formation of channels composed of tumor cells that do not display endothelial markers. These malignant capillarylike structures, first observed in melanoma by Folberg et al. [5], are connected to the conventional vascular system and are able to carry blood cells. Because this mechanism has never been shown to participate in embryonic or teratocarcinoma vascularization, it will not be discussed in the present review.

Besides supplying oxygen and nutrients to otherwise hypoxic solid tumors, neovascularization also favors the spread of malignant cells to distant sites within the body. As we discuss, metastasis is further facilitated by certain features of tumoral vascularization, which are, at least partially, determined by the mechanism responsible for neovascularization. Interestingly, some of the currently used therapeutic antitumoral agents preferentially disrupt one of the known vascularization mechanisms. Therefore, a better understanding of the vascularization process in TGCTs will likely lead to the development of novel therapeutic approaches for the treatment of those tumors refractory to conventional cisplatin-based treatment.

## 2. The TGCT microenvironment and its relationship to vascularization

The vascular network in the adult male gonads exhibits high stability, with neovascularization events being practically nonexistent. Nevertheless, analysis of the proliferation rate of testicular endothelial cells revealed considerably higher values in the testis than in other tissues such as the liver, brain, and muscle [6]. Owing to the absence of evidence pointing to major vascular remodeling or neovascularization, it is likely that the observed high proliferation rate is related to increased endothelial cell turnover. This process seems to be largely hormone regulated, as endothelial cell proliferation is significantly reduced after Leydig cell depletion [6], probably through the induction of the expression of vasculogenic and angiogenic factors. Some of these factors, such as vascular endothelial growth factors A and B (VEGF-A and VEGF-B) or angiotensin I and II (Ang I and II) [7], have well-known effects on endothelial and smooth muscle cells. Furthermore, other factors that have been associated with male gonad development, germ cell differentiation, or regulation of testicular function, such as interleukin-6 (IL-6), insulinlike growth factor (IGF), KLF4 transcription factor, or SDF1/CXCR4 axis, among others, could also act as important mediators of neovascularization (Fig. 1).

The VEGF family is a group of secreted glycoproteins, including the following: VEGF-A (commonly known as VEGF and the most studied member of the family), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, EG-VEGF (endocrine gland-VEGF), VEGF-E, VEGF-F, and placental growth factor (PlGF). VEGF is known to be expressed by a wide variety of nonendothelial cells, including smooth muscle cells, fibroblasts, and some immune system cells, triggered by microenvironmental signals, such as hypoxia, and a number of growth factors [8]. During embryogenesis, high VEGF levels are needed to generate the vascular network, as revealed from studies in which knocking out VEGF and VEGF receptor resulted in an embryonic lethal phenotype [9]. Although VEGF demand decreases when the vascularization process is completed and the oxygen supply sufficient, a certain VEGF expression level, such as that found in adult testes, is still required to stabilize the vascular network.

Taking advantage of the functional and genetic similarities between testicular CIS and ES cells [3], our group has recently developed an *in vivo* model for nonseminomatous TGCTs based on the transplantation of green fluorescent protein-transfected ES cells into the seminiferous tubules of adult mice [10]. Histological analysis of the ensuing tumors revealed the presence of well-differentiated structures, derived from the 3 germ layers, together with an undifferentiated component constituted by EC cells, with the overall aspect of these tumors being similar to that of spontaneous TGCTs of the same category [11]. Using this model, we were able to observe some of the hallmark features of the

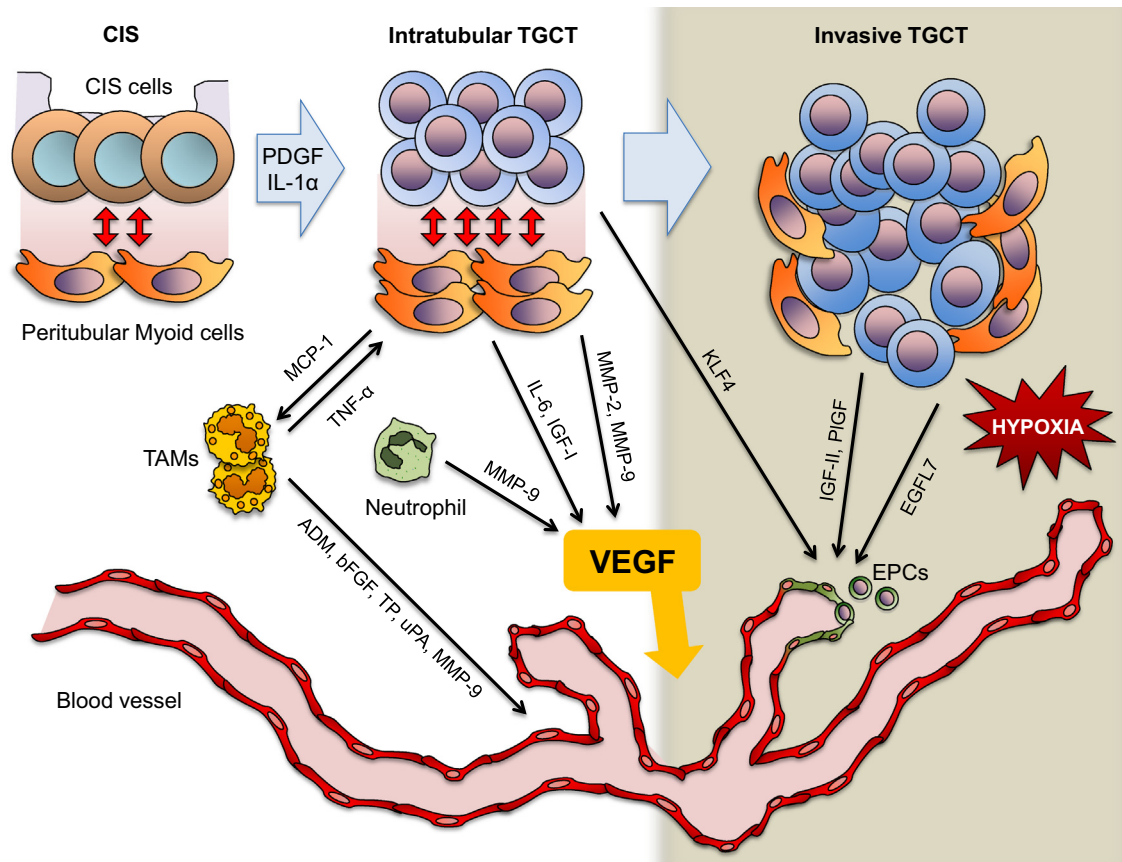


Fig. 1. The TGCT microenvironment and vascularization. There are several factors in the testicular microenvironment, such as PDGF and IL-1 $\alpha$ , that have been shown to induce peritubular myoid cell (PTC) growth and proliferation. Excessive amount of PTCs in TGCTs could unbalance their cross talk with tumor cells and contribute to malignancy progression. PTC-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) has been described to favor the recruitment of tumor-associated macrophages (TAMs) [20], which in turn could stimulate PTC secretory activity through the expression of TNF- $\alpha$ . PTCs and other testicular cells, such as Sertoli, Leydig, and germ cells, are known to be able to secrete IL-6 and IGF-I, which participate in neovascularization through the induction of VEGF expression in a number of cancer types [19]. TAMs themselves have been demonstrated to secrete factors that promote vascularization, including VEGF, adrenomedullin (ADM), basic fibroblast growth factor (bFGF), thymidine phosphorylase (TP), urokinase-type plasminogen activator (uPA), and the gelatinase MMP-9 [23]. MMP-2 and MMP-9 gelatinases are also secreted by PTCs and tumor cells. These enzymes cleave matrix-anchored VEGF, thereby increasing the availability of bioactive VEGF and, additionally, possibly acting as a chemoattractant of MMP-9-expressing neutrophils. Krüppel-like factor 4 (KLF4) is a pluripotency-related transcription factor whose expression is up-regulated in intratubular germ cell tumors [28]. It is known to regulate vasculogenesis during embryonic development, suggesting that it could play an important role during TGCT neovascularization. The formation of hypoxic regions is a hallmark of solid tumors. Several studies have shown that hypoxia favors the recruitment of endothelial progenitor cells (EPCs) through the up-regulation of IGF-II [30]. Low oxygenation levels are also known to up-regulate the expression of several vascularization-promoting factors in ES and EC cells, such as placental-like growth factor (PLGF) and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) [33]. Hypoxia also up-regulates the expression of epidermal growth factor–like domain 7 (EGFL7) in endothelial cells, a factor that promotes endothelial cell proliferation, migration, and invasion [26]. (Color version of figure is available online.)

reactive tumor stroma of TGCTs, such as the accumulation of myofibroblasts expressing  $\alpha$ -smooth muscle actin and extracellular matrix (ECM) proteins (Fig. 2A–C). Cell-tracing studies have shown that the activation of normal fibroblasts and the epithelial-mesenchymal transition are the most frequent mechanisms of myofibroblast generation [12]. In the case of TGCTs, an additional source of these cells might be the testicular peritubular myoid cells (PTCs) of the testis (Fig. 2A, B, and D). This  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cell population surrounds the seminiferous tubules, and its secretory products take part in the regulation of testicular function [13]. A number of factors present in the testis, such as platelet-derived growth factor (PDGF) and IL-1 $\alpha$ , which are usually overexpressed in tumors, have

been shown to induce PTC growth and proliferation [14,15]. Among the products secreted by PTCs, several ECM components have been found, including collagen I, IV, and XVIII, fibronectin, laminin and osteonectin. Together with these structural proteins, PTCs were also found to express nerve growth factor, monocyte chemoattractant protein-1, and inflammatory interleukins, such as IL-6 [16]. The secretory activity of PTCs is up-regulated by tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , a proinflammatory cytokine produced by cells of the immune system, including the mastocytes that reside within the testicular mesenchyme [17].

It is known that the formation of new capillaries, by either angiogenesis or vasculogenesis, is dependent on the composition of the surrounding matrix. In fact, it has been



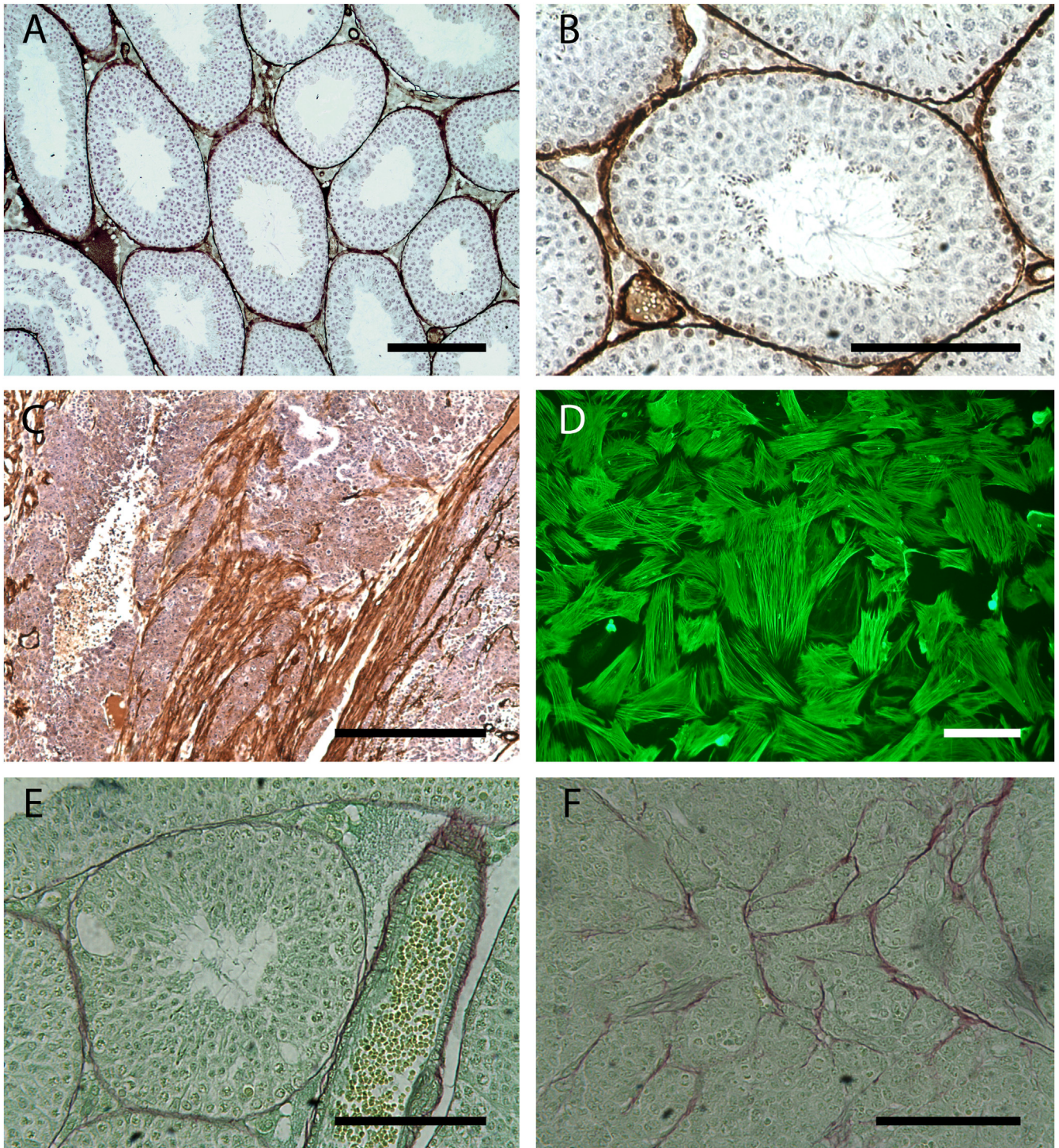


Fig. 2. Distribution of myofibroblastlike cells. In the healthy testis, peritubular myoid cells (PTCs) can be observed as a thin layer surrounding the seminiferous tubules (A and B). These cells are frequent in experimental testicular tumors generated after the microinjection of ESCs into the seminiferous tubules (C). PTCs can be isolated by outgrowth from explants of mouse seminiferous tubules and exhibit a dense actin cytoskeleton, as observed by fluorescent phalloidin staining (D). PTCs are responsible for the secretion of ECM proteins involved in the formation of the basal membrane of intact seminiferous tubules (collagen-specific Sirius red staining; E). In the healthy testis, collagen (dark red) forms a continuous thin layer that surrounds the seminiferous tubules and a thicker layer enclosing the capillaries (a longitudinal section of a capillary can be observed in the right side of panel E). In turn, experimental testicular germ cell tumors (TGCTs) display large collagen accumulations without structural organization (F). Scale bars represent 100  $\mu\text{m}$  in (A), (B), (D), and (E) and 200  $\mu\text{m}$  in (C) and (F). (Color version of figure is available online.)

reported that an inhibition of collagen synthesis can result in the suppression of neovascularization [18]. As an explanation for the effect of ECM composition on this process, 2 different processes have been proposed. First, ECM proteins may modulate the bioavailability of growth factors by sequestering them. This has been shown to occur in colorectal cancer in which VEGF bioavailability is increased by means of the cleavage of ECM proteins. The augmented expression of the MMP-2 collagenase by EC cells cultured under low oxygen concentrations, a microenvironment that mimics that of the hypoxic solid tumor, points to a similar mechanism in TGCTs [7]. In patients with colorectal cancer, another collagenase, MMP-9, has been found to be significantly correlated with VEGF levels, with MMP-2 levels being, however, irrelevant [19]. Another possible mechanism implies the transduction of tractional forces through the components of the ECM. In fact, an experimental in vitro model in which tensional forces were generated on a fibrillar ECM was sufficient to guide directional outgrowth of endothelial cells.

In the testis, IL-6 is expressed by germ cells, Leydig cells, and PTCs, and it regulates testis development and function (Fig. 2). This cytokine has been further reported to participate in the development of the vascular network in early embryos through a mechanism that involves induction of VEGF expression and activation of the IL-6-gp130-STAT3 signaling pathway [20]. Actually, IL-6 loss decreases VEGF production, and STAT3-null mice display reduced capillary density and increased intercapillary distances [20]. Similarly, inhibition of the IL-6 receptor by means of specific blocking antibodies resulted in decreased vascularization in experimental models [21]. The expression pattern and known functions of IL-6 suggest a mainly vasculogenic potential. In fact, studies in which the effect of IL-6 on EPCs derived from circulating mononuclear cells was analyzed revealed that this cytokine stimulates EPC proliferation and migration, and the formation of tubular structures in *Matrigel* gels [22]. Regarding cancer, it has been reported that in colon malignancies, IL-6 is released by the tumor-associated fibroblasts playing a critical role in tumor vascularization, probably through the induction of VEGF secretion [23]. The immune cells within the tumor have been proposed to be major drivers of tumor vascularization. Since the role of tumor-associated macrophages (TAM) as mediators of vascularization was hypothesized a couple of decades ago, several studies have demonstrated a positive correlation between blood vessel density and the number of infiltrating macrophages in human tumors [24]. TAMs secrete a number of factors that directly or indirectly promote vascularization, including members of the VEGF family, adrenomedullin [25], basic fibroblast growth factor, thymidine phosphorylase and urokinase-type plasminogen activator [26], and gelatinase MMP-9 [27]. It has been shown that the depletion of TAMs leads to a delay in tumor vascularization and reduced growth in a number of cancer types, such as liver carcinomas and T-cell lymphomas [28].

Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) is a recently discovered secreted protein, which is expressed by endothelial cells during embryonic development and participates in the formation of blood vessels [29]. Hypoxic microenvironments, such as those present in malignant tumors, up-regulate the expression of EGFL7 in endothelial cells and lead to neovascularization through the promotion of endothelial cell proliferation, migration, and invasion [30]. Interestingly, EGFL7 is also expressed by PGCs in the developing gonads from 11.5 to 15.5 dpc. Although its expression is lost after 15.5 dpc, it is transiently recovered in the postmeiotic phase of adult germ cells [31], and might therefore participate in the early vascularization of TGCTs. Similarly, the Krüppel-like factors 2 and 4 (KLF2 and 4), which are pluripotency-related transcription factors expressed in endothelium, epithelium, and mesenchymal tissue, including testes, have been found to participate in mouse embryonic vascularization, contributing to endothelial integrity through the up-regulation of eNOS, VEGF-R2, and occluding genes. In the adult testes, expression of KLF4 is detected in Sertoli cells and, with a high intensity, in postmeiotic germ cells. Nevertheless, its deletion does not impair spermatogenesis, and the mutant animals retain fertility [32]. Although its precise effect has not been studied yet in TGCTs, its overexpression in germ cell tumors and seminomas suggests an important role in the vasculogenic process in this type of malignancy.

Another important component of the neoplastic microenvironment is the concentration of oxygen, as the formation of hypoxic regions is inherent to most solid tumors. It has been demonstrated in vitro that hypoxic conditions induce faster proliferation and higher apoptosis resistance in different cell types, including ES and EC cells. According to these results, hypoxia could increase cancer stem cell (CSC) proliferation and survival in solid TGCTs. Other studies suggest that hypoxia could recruit EPCs through the up-regulation of IGF-II expression. In fact, it has been demonstrated in vivo that IGF-II induces neovascularization by acting on EPC invasion and adhesion [33]. Hypoxia is also known to up-regulate the expression of several vascularization-promoting factors in ES and EC cells, such as placental growth factor and VEGF-A. Moreover, the differentiation of ES/EC cells into endothelial precursors, which we observed in our experimental teratocarcinoma model, seems to be, at least partially, supported by the hypoxic microenvironment [34].

As we have seen, the microenvironment of both pre-malignant and cancerous testicular tissue displays high concentrations of vasculogenic and angiogenic factors. These factors, which are normally tightly regulated in the healthy testicular stroma, could accelerate the vascularization of the malignant tissue when the invasion process begins leading to loss of balanced tissue homeostasis. Furthermore, changes in the testicular microenvironment, owing to cancer cell growth and the subsequent inflammatory response, may lead to a higher number of peritubular

cells with up-regulated secretory activity. Because many of the molecular signaling pathways and cellular processes are shared between the mechanisms of angiogenesis and vasculogenesis, it is frequently difficult to discriminate between them. Nevertheless, the study of the microenvironment of tissues in which vasculogenesis is predominant, such as early embryos, and its comparison with that present in tissues undergoing major angiogenesis-driven vessel remodeling, for example, a healing wound, might throw some light on their differences.

### 3. Vasculogenesis and angiogenesis during embryonic development and in teratocarcinomas

Teratocarcinomas, such as nonseminomatous TGCTs, are frequently referred to as “caricatures” of normal embryonic development, and accordingly, many of the observations made in early embryos can be extrapolated to this type of tumor. The circulatory system is the first one that is formed during embryonic development. The initial vascularization-related event in the embryo consists the formation of aggregates composed of mesoderm-derived endothelial precursors that further form a primitive network. This original vasculogenic process is followed by angiogenic remodeling, resulting in the primitive vessel network that serves as a basic template for the mature vascular system. Recombination of heterospecific embryonic tissues and subsequent analysis of vascular invasion from one tissue into another is one of the methods used to discriminate between embryonic angiogenesis and vasculogenesis. For example, recombination of quail and mouse tissues at embryonic day 9 of development (E9) suggests that during late mammalian embryogenesis, both mechanisms occur simultaneously, with each however being responsible for the vascularization of different regions of the embryo [35]. Thus, in mice, angiogenesis is responsible for the formation of the vascular plexus of limbs, whereas visceral organs are mostly vascularized by a vasculogenic process. It has also been shown that in later stages of testis development (E11.5), pre-existing capillaries of the adjacent mesonephros break down, releasing individual endothelial cells that are recruited by the gonadal vascular network [36]. A similar endothelial cell invasion process has been reported to occur in tumors. To study these events, Timmins et al. [37] devised an experimental platform based on tumor-derived multicellular spheroids and human vein cord endothelial cells (HUVECs). In their experiments, they used the hanging-drop method for the coculture of HUVECs with tumor-cell aggregates. Even without the addition of factors or ECM substitutes to promote vascularization after several days of coculture, the formation of a 3-dimensional HUVEC-derived microvascular network in the spheroids was observed [37]. These results suggest that the ability to attract host-derived endothelial cells is likely to be

retained by TGCTs, in which adult testicular tissue, as well as malignant and embryonic derivatives, are present.

In addition to the conventional “physiological” type of vasculogenesis, which involves the differentiation of circulating EPCs, a tumor-derived vasculogenesis has been described in which malignant cells give rise to TECs that incorporate into the vascular network. This process has been reported in a number of tumor types, including glioblastoma and colorectal, breast, and ovarian cancers. Transdifferentiation of tumor cells into endothelial ones was initially speculated. However, the discovery of a pluripotent stem cell population in several cancer types, the so-called CSCs (for a review of this topic we refer the reader to [38]), pointed to these pathological stem cells as the origin of TECs. The neoplastic endothelial cells display enhanced angiogenic activity and higher resistance to a number of chemotherapeutic drugs compared with normal endothelial cells and therefore might play a role in tumor progression. Regarding TGCTs, TECs were also reported to be present in teratocarcinomas generated after the transplantation of ESCs into the seminiferous tubules. As previously mentioned, in these experiments, ESCs were used as a surrogate of the CIS of the testis and microinjected into the tubular compartment of immunocompatible animals. On transplantation, these cells colonize locations inside the seminiferous epithelium close to the niche of the CIS and subsequently generate tumors with the histopathological features of TGCTs [11]. Immunohistochemical analysis of these tumors confirmed that besides host-derived vasculature, a small portion of the newly formed vessels had originated from the transplanted fluorescent ESCs. It was later revealed that hypoxia might not be enough to induce the differentiation of the CSC population of TGCTs, the EC, into vascular precursors [34]. Therefore, it is possible that the *in situ* differentiated endothelial cells resulting from tumor cells might be present in spontaneous TGCTs, with such events occurring more frequently during the initial stages of tumor development, when the pluripotent CIS cells are more abundant.

Because embryoid bodies (EBs) display a histological pattern that resembles that of teratocarcinomas, including fully differentiated tissues together with undifferentiated stem cell populations, they represent a valuable *in vitro* model to study the formation of the neoplastic vascular plexus in this kind of tumor. In EBs, all cell lineages, including endothelium, come from the pluripotent cells initially used to generate the aggregates. In these experiments, pluripotent stem cells, such as ESCs or PGCs, are used as starting material, and their differentiation into the endothelial lineage reproduces to some extent tumor-derived vasculogenesis. Using large-scale screening of gene expression, Gerecht-Nir et al. [39] discovered that the differentiation of human ESCs (hESCs) into vascular precursors is highly favored in 3-dimensional aggregates compared with 2-dimensional cultures. In their experiments, the vasculogenic process resulted in the formation of a

network of CD34-positive vessellike structures after 4 weeks in culture [39]. Nevertheless, using other models, vasculogenesis seems to be less common or even absent. For instance, analysis of teratomas formed after the injection of hESCs in severe combined immunodeficiency mice revealed that none of the genes involved in neovascularization, such as VEGFR-2, were expressed by the tumors [40]. Apparently, the vasculature of the formed solid tumors had mainly originated from angiogenic invasion from the murine host, with the *in situ* differentiation of hESCs being very restricted. In a similar series of experiments, transplantation of murine ESC-derived EBs onto quail chorioallantoic membranes caused a marked increase in the vasculature of the membranes toward the graft [41]. The authors pointed to a significant increase in host angiogenesis as being responsible for the new vascular network, but *in situ* differentiation of EB-derived cells was not reported. It has also been reported that EBs formed from quail ESCs require the addition of basic fibroblast growth factor to the culture medium to form a vascular network [42]. These facts suggest that the spontaneous vasculogenic mechanism through which vascular structures arise from transformed cells might not be an intrinsic behavior, but rather, one that is strongly dependent on cell origin and stemness, and specific biochemical and mechanical stimuli, which might be or not present in the microenvironment of TGCTs [43].

### 3.1. Architecture of the vascular plexus

Several groups have attempted to discriminate between the different vascularization mechanisms by applying mathematical models. In some approaches, cells following a vasculogenic program generated the architecture of the neoplastic vascular network, whereas in others, an angiogenic process produced capillaries. Using this strategy, significant differences in the theoretical growth rate of tumors being vascularized by one process or the other have been hypothesized [44]. Thus, basic model tumors employing ordinary differential equations predict that angiogenesis-generated vessels will grow faster than those contain a vasculogenic network. Considering the rapid growth of TGCTs, this model would predict a mostly angiogenesis-driven process. However, this approach only considers circulating EPCs, coming from the host's bone marrow, as a source of pluripotent cells. As we have already mentioned, TGCTs have the peculiarity of containing, together with fully differentiated tissues, a population of CSCs that may also participate in the vasculogenic process. Furthermore, the gonadal microenvironment might significantly promote the invasion of host EPCs into the tumor. It is important to remember that these differences at the cellular level affect the resulting vascular pattern, as well as the characteristics of the vessels, which conform it. For example, a distinct branching angle of the capillaries generated by either mechanism has been hypothesized

[45]. However, this observation requires further evidence for the hypothesis to be substantiated. As we will see, the vascular architecture of the vascular network of TGCTs can explain many of the features of these tumors.

Testes receive their blood supply from the testicular artery, which originates directly from the abdominal aorta. The testicular artery divides into 2 branches just above each testis. One of them supplies the epididymis, whereas the other approaches the gonad surrounded by a network of small veins called the pampiniform plexus (Fig. 3A). The main function of this structure is to assist blood flow to and from the testis, while facilitating the cooling of oxygenated blood from abdominal to testicular temperature. Arterial-venous connections between the testicular artery and the pampiniform vein plexus have been described in adult male gonads and are considered a controllable system used to bypass the testicular blood flow [46]. Before entering the testis, the artery surrounds the testis and branches into numerous daughter vessels that enter the parenchyma. Once inside the gonads, arteries further divide into capillaries that surround the seminiferous tubules. There are 2 different types of capillaries that have been reported in the testis, being characterized by their different orientation. The longitudinal ones run parallel to the seminiferous tubules and can be clearly seen in histological images (Fig. 3B). In turn, the transverse vessels “embrace” the seminiferous tubules, connecting the longitudinal capillaries every 100 to 200  $\mu\text{m}$ . Corrosion casting in combination with scanning electron microscopy is a widely used tool to evaluate tumor vascularization. This technique allows the direct observation of the vascular tree and the precise quantification of the 3-dimensional morphological features of the vascular network of normal and malignant tissues. In the case of the testis, corrosion casting revealed that the hierarchical organization of the capillaries endows on the network a unique hexagonal geometry (Fig. 3C). The spatial arrangement of this vascular system shows characteristic branching angles and a homogeneous vascular density that is well conserved between individuals [11].

In the case of testicular cancer, this pre-existing highly regular vascular network is remodeled and extended following chemical and physical cues. The existence of 2 distinct vascularization mechanisms in TGCTs was already reported in 1990. In that study, the origin of endothelial cells forming the capillaries was determined based on their histological aspect; those cells containing aberrations such as multiple nuclei or forming capillaries with increased luminal size were classified as arising from “embryonal angiogenesis” [47]. Nowadays, it is accepted that this “neoplastic” vasculogenesis (i.e., the *de novo* formation of vessels from tumor-derived endothelial cells) is present in a number of tumor types. The experimental TGCT model developed in our group showed significantly increased vessel luminal sizes (Fig. 3D–F) [34]. As previously mentioned, TGCTs are characterized by the deposition of considerable amounts of ECM proteins by malignant and

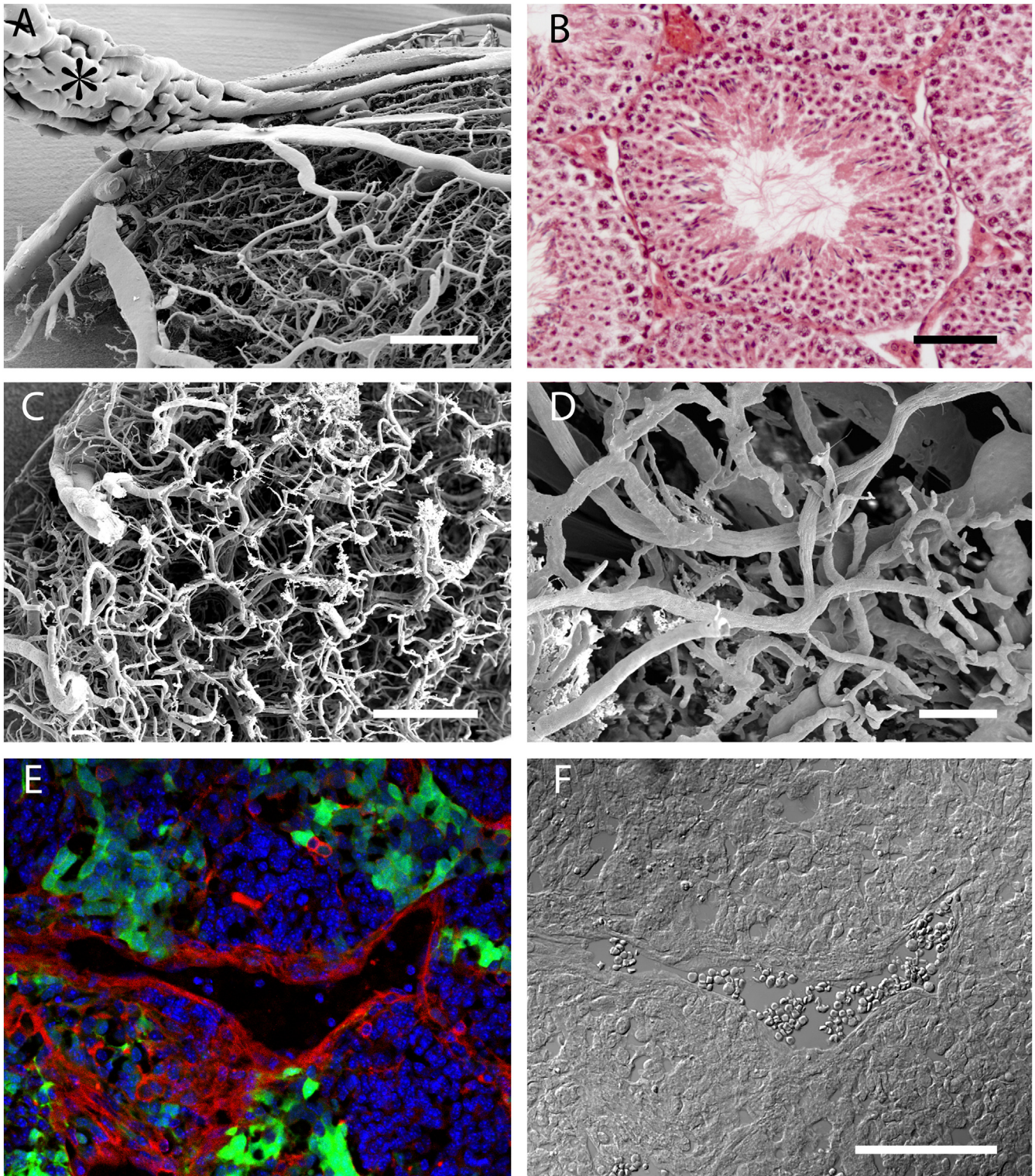


Fig. 3. Vascularization of the murine testis. Scanning electron micrographs of corrosion casts show the testicular artery surrounded by the pampiniform plexus (asterisk in A). The longitudinal capillaries of the testis are found in the intratubular space, as observed in histological preparations (B). In turn, transverse capillaries surround the seminiferous tubules giving the vascular corrosion casts a characteristic hexagonal geometry (C). In turn, high-magnification imaging of tumor-derived vascular casts reveals highly disorganized vessel network with architectures incompatible with normal laminar blood flow (D) that results in abnormal vascular shapes as observed in histological sections (E; red immunofluorescence against anti-CD31, green autofluorescence for tissue coming for transplanted GFP-ES-cells, and blue for DAPI). However, these vessels are able to carry blood cells, as seen in a DIC image of the same region (arrow in F). Scale bars represent 500  $\mu\text{m}$  in (A) and (C), 50  $\mu\text{m}$  in (B), 200  $\mu\text{m}$  in (D), and 100  $\mu\text{m}$  in (E) and (F). DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole; DIC = differential interference contrast; GFP = green fluorescent protein. (Color version of figure is available online.)

host cells (Fig. 3E and F). The biophysical features of this ECM found in the solid tumor may also influence the features of the resulting vascular network. In particular, a relationship between ECM stiffness and vessel shape has been observed in a number of system models. For instance, using in vitro microfluidic devices, Shamloo and Heilshorn [48] studied the effect of different collagen concentrations on the resulting vessel network. It was observed that a concentration of approximately 1.2 to 1.9 mg/ml gave rise to stable vessel sprouts; lower densities resulted in uncoordinated endothelial cell migration and higher ones hindered sprout formation [48]. Similarly, EPC-derived vessel density was significantly reduced in matrices containing high concentrations of collagen, and the mean lumen size of the formed vessels was found to be larger [49]. These observations suggest an increased ECM-protein concentration as a possible cause of the increased size of TGCT capillaries. This phenotypic feature causes turbulence in blood flow and subsequently is one of the causes that drive defective oxygenation in tissues. Inside the neoplastic vessels, shear stress distribution caused by blood circulation is altered, and certain regions are probably under increased stress, whereas in other locations, this mechanical load is reduced. Interestingly, this mechanical feature of blood flow has been shown to negatively regulate the angiogenic process [50].

Further evidence of immature tumor-derived vasculogenesis in TGCTs include the presence of blind capillaries [47], and an organization incompatible with correct tissue oxygenation (Fig. 3D–F) [7]. In turn, intervascular and interbranching distances were shorter in the experimental TGCTs, pointing to increased vascular densities in the neoplastic tumors compared with the premalignant testis. It has been shown in a number of tumor types that these features that characterize the vascular bed are hallmarks of malignant tissues and are clearly different to the non-malignant vascular architecture of the host organ [51]. In fact, vascular architecture is directly related to the metastatic process. Some authors have found a direct relationship between vascular density and metastatic potential, as better vascular networks imply more irrigation and more chances for malignant cells to invade. For instance, increased vascular density in retinoblastoma correlates with invasiveness and with the presence of metastasis at the time of diagnosis [51]. Similarly, in TGCTs, a direct correlation between syndecan-4 expression, microvascular density, and occurrence of metastasis has been found [52]. In fact, corrosion casts of experimental TGCTs show frequent extravasations, because of faulty capillaries, which could theoretically facilitate cell extravasation [7].

As we have seen, the normal testicular tissue contains large amounts of vasculogenic and angiogenic factors that most likely trigger the rapid vascularization of the tissue at the onset of the invasive process. This process further disrupts the precise regulation of the angiogenic and vasculogenic components and causes the uncontrolled and disorganized formation of new capillaries. Thus, these

newly formed vessels generate a tortuous and leaky structure that makes them unsuitable for a correct oxygen transportation, promoting the formation of hypoxic regions within the solid tumor [7].

### 3.2. Vascularization as a complementary therapeutic target for TGCTs therapy

Cisplatin chemotherapy is the standard treatment for patients with advanced nonseminomatous TGCTs and for those that retain increased tumor markers in blood after orchiectomy. This strategy render overall cure rates higher than 80%; however, in those cases with cisplatin-resistant or cisplatin-refractory disease, survival rates are small, making new therapeutic alternatives necessary. Although many of the cellular mechanisms that promote cisplatin resistance, such as glutathione-dependant cytoplasm detoxification, DNA repair, and apoptosis deregulation are known, in the last decades, only few novel chemotherapeutic agents for the treatment of TGCTs have been developed. Although some of them have provided promising results, the treatments are frequently associated with extensive side effects. As in other tumors, neovascularization is necessary to support the growth of TGCTs and is considered to be a key factor in tumor growth and progression, pointing to this process as a potential complementary therapeutic target for the newly developed drugs. The vascularization-targeted treatments should optimally modulate both mechanisms, angiogenesis and physiological vasculogenesis, and completely abolish tumor-derived vasculogenesis, to normalize the vascular network of the tissue. This would further reduce the formation of hypoxic regions and capillaries with immature features, subsequently reducing tumor malignancy and metastatic events. The restoration of a functional vascular system would further increase the effectiveness of chemotherapeutic drugs and tumor irradiation [53].

Although most of the signaling pathways involved in vascularization mechanisms are shared, some chemical compounds have been found to selectively affect one process over another. This is the case of TNFSF15, a cytokine naturally secreted by endothelial cells, which modulates EPC differentiation by reducing the expression of VEGF-R1 in EPCs. Consistently, progenitor cells treated with TNFSF15 in vitro reduce their ability to migrate, proliferate, and form capillarylike structures in the *Matrigel* assay [54]. Similarly, *Zoledronate*, a compound approved for the treatment of bone-related diseases, has been proven to reduce the vasculogenic effects of Ang II in cultured EPCs [55]. Because Ang II has been found in both healthy testicular tissue and experimental TGCTs [7], it is feasible that in this type of cancer *Zoledronate* may reduce the generation of vasculogenic vessels.

*Sunitinib*, a multitargeted kinase inhibitor, which has been approved by the US Food and Drug Administration for the treatment of renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors has yielded promising results in TGCTs.

This compound administered to mice previously implanted with testicular tumors of different origins inhibited the phosphorylation of VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, and PDGF-R alpha, reducing tumor vasculature and growth [56], probably through the inhibition of both angiogenesis and vasculogenesis. Another therapeutic approach takes into account the expression and secretion of extra domain B fibronectin exclusively in tissues undergoing growth or extensive vascular remodeling, including cancer. Furthermore, this ECM component has been shown to efficiently colocalize with neovasculature, and therefore could be used to target newly formed, malignant capillaries. Berndorff and coworkers (2005) tested different radiolabeled antibody variants against extra domain B fibronectin in mice inoculated with the embryonal cell line F9 [57] and found reduced teratoma growth and improved survival in treated mice.

Because TGCT vascularization is highly favored by products secreted by tumor cells, treatments in which the expression levels of these factors are reduced represent a potential approach for treatment. This is the case of Resveratrol, a natural polyphenol, which has been shown to reduce VEGF secretion and HIF-1 $\alpha$  stabilization in melanoma cells [58]. Similarly, ZD1839, an EGFR-tyrosine kinase selective inhibitor, significantly reduces the expression of vascularization-related genes in a number of cancer types, and results in reduced tumor vascularization and growth [59]. Regarding testicular tumors, using an *in silico* screening approach, Nitzsche et al. [60] were able to describe 2 novel antiangiogenic compounds, named HP-2 and HP-14. Genetic analysis of treated human EC cell lines revealed the ability of both drugs to reduce the secretion of not only vascularization-related factors, such as MMP-2, PDGF-A, and PDGF-B, but also of the membrane endothelial marker VEGF-R2. It would be interesting to determine if this reduces the number of cancer cells that incorporate into the neoplastic vascular network of TGCTs.

#### 4. Conclusions and outlook

Most of the data presented here, including theoretical considerations and experimental models, and analysis of the microenvironment and cellular components of teratocarcinomas, point to angiogenesis as the main player in TGCT vascularization, with EPC-derived and tumor-derived vasculogenesis being minority events. Nevertheless, considering the special features of the testicular endothelium and the testis microenvironment, including high turnover rates of endothelial cells, the extragonadal origin of embryonic precursors, and high hormonal levels, the possibility of other processes playing a role in TGCT vascularization cannot be completely excluded. It should not be forgotten that although spontaneous TGCT-derived cells might not be able to generate large portions of endothelium, the phenotypic and functional characteristics of TECs may

significantly affect tumor prognosis. As discussed earlier, these cells presumably display defective mechanical features and, even in low number, may well be the cause of enhanced capillary permeability, subsequently increasing the risk of metastatic extravasation. Furthermore, tumor cells can stimulate, by means of secreted factors, the angiogenic switch in adjacent tissues and promote the invasion of the host vasculature into the solid tumor. The spatial arrangement of the resulting vascular network is also an interesting aspect, as some architecture can hinder the correct flow of blood and therefore trigger a hypoxic response in the tissue [7].

Research on TGCT vascularization and its underlying mechanisms may be extended further to investigate possible therapeutic strategies that specifically target EPCs, the differentiation of CSCs into vascular cells, or the secretion of vascularization factors. In the case of testicular tumors, the importance of peritubular cells should be noted, as besides infiltrating immune cells, these cells may have a wider effect on neoplastic vascularization. More rational, vascularization-based therapeutic treatments for TGCT can be developed in the future based on a more complete understanding of the particular nature of these tumors; this more in-depth understanding will be the fruit of various experimental approaches such as transplantation of tumor-related cells into the seminiferous tubules, analysis of the embryonic vascularization process in different species, xenograft recombination using embryonic and adult tissues, and more complete theoretical models.

#### Acknowledgments

Owing to the limitation on the number of references that can be included in this review, we would like to apologize to those authors whose work was not cited. We thank Dr. David Fogarty for critical reading of the manuscript and Mr. Juan L. Vidaurrázaga for his editorial assistance. U. Silván, A. Díez-Torre, M. Díaz-Núñez, and P. Moreno enjoyed fellowships from the Spanish Ministry of Education and Science, the University of the Basque Country (UPV/EHU), and the Jesús De Gangoiti Barrera Foundation in Bilbao (Spain).

#### References

- [1] Fallon R, Olshan A, Saxman S. Male genital tract cancer. In: Bleyer A, O'Leary M, Barr R, Ries LAG, editors. *Cancer epidemiology in older adolescents and young adults 15 to 29 years of age, including SEER incidence and survival: 1975-2000*. Bethesda: National Cancer Institute, NIH Publications; 2001;155–62.
- [2] Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 2005;5:210–22.
- [3] Almstrup K, Sonne SB, Høi-Hansen CE, Ottesen AM, Nielsen JE, Skakkebaek NE, et al. From embryonic stem cells to testicular germ cell cancer—should we be concerned? *Int J Androl* 2006;29:211–8.
- [4] Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004;117:3–32.





- editor. Embryonic stem cells—recent advances in pluripotent stem cell-based regenerative medicine. Vienna: InTech Open Access Publisher; 2011;371–98.
- [39] Gerecht-Nir S, Dazard JE, Golan-Mashiach M, Osenberg S, Botvinnik A, Amariglio N, et al. Vascular gene expression and phenotypic correlation during differentiation of human embryonic stem cells. *Dev Dyn* 2005;232:487–97.
- [40] Gerecht-Nir S, Osenberg S, Nevo O, Ziskind A, Coleman R, Itskovitz-Eldor J. Vascular development in early human embryos and in teratomas derived from human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004;71:2029–36.
- [41] Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988;102:471–8.
- [42] Krah K, Mironov V, Risau W, Flamme I. Induction of vasculogenesis in quail blastodisc-derived embryoid bodies. *Dev Biol* 1994;164:123–32.
- [43] Silván U, Díez-Torre A, Moreno P, Arluzea J, Andrade R, Silió M, et al. The spermatogonial stem cell niche in testicular germ cell tumors. *Int J Dev Biol* 2013;57:185–95, <http://dx.doi.org/10.1387/ijdb.130068ja>.
- [44] Komarova NL, Mironov V. On the role of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization. *J Theor Biol* 2005;235:338–49.
- [45] Chen JJ, Lin Y-H, Chiang C-S, Hong J-H, Yeh C-K. Characterization of tumor vasculature derived from angiogenesis and vasculogenesis by high-frequency three-dimensional doppler ultrasound. *International ultrasonics symposium* 2010;2319-2322.
- [46] Skowroński A, Jedrzejewski K. The human testicular artery and the pampiniform plexus—where is the connection? *Folia Morphol (Warsz)* 2003;62:201–4.
- [47] Nacov E. Tumor angiogenesis formation of vessels de novo at germ cell tumors. *Cancer* 1990;669:916–22.
- [48] Shamloo A, Heilshorn SC. Matrix density mediates polarization and lumen formation of endothelial sprouts in VEGF gradients. *Lab Chip* 2010;10:3061–8, <http://dx.doi.org/10.1039/c005069e>.
- [49] Critser PJ, Kreger ST, Voytik-Harbin SL, Yoder MC. Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo. *Microvasc Res* 2010;80:23–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2010.03.001>.
- [50] Chouinard-Pelletier G, Jahnson ED, Jones EA. Increased shear stress inhibits angiogenesis in veins and not arteries during vascular development. *Angiogenesis* 2013;16:71–83, <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-012-9300-2>.
- [51] Rössler J, Dietrich T, Pavlakovic H, Schweigerer L, Havers W, Schüller A, et al. Higher vessel densities in retinoblastoma with local invasive growth and metastasis. *Am J Pathol* 2004;164:391–4.
- [52] Labropoulou VT, Skandalis SS, Ravazoula P, Perimenis P, Karamanos NK, Kalofonos HP, et al. Expression of syndecan-4 and correlation with metastatic potential in testicular germ cell tumours. *Biomed Res Int* 2013;214864, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/214864>.
- [53] Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev* 2011;91:1071–121, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00038.2010>.
- [54] Tian F, Liang PH, Li LY. Inhibition of endothelial progenitor cell differentiation by VEG1. *Blood* 2009;113:5352–60, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-08-173773>.
- [55] Yang JX, Chen B, Pan YY, Han J, Chen F, Hu SJ. Zoledronate attenuates angiogenic effects of angiotensin II-stimulated endothelial progenitor cells via RhoA and MAPK signaling. *PLoS One* 2012;7:e46511, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046511>.
- [56] Castillo-Avila W, Piulats JM, Garcia Del Muro X, Vidal A, Condom E, Casanovas O, et al. Sunitinib inhibits tumor growth and synergizes with cisplatin in orthotopic models of cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15:3384–95, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2170>.
- [57] Berndorff D, Borkowski S, Sieger S, Rother A, Friebe M, Viti F, et al. Radioimmunotherapy of solid tumors by targeting extra domain B fibronectin: identification of the best-suited radioimmunoconjugate. *Clin Cancer Res* 2005;11:7053–63.
- [58] Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, Willmott L, Fruehauf JP. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis* 2010;13:305–15, <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-010-9187-8>.
- [59] Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Cuccato S, et al. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2001;7:1459–65.
- [60] Nitzsche B, Gloesenkamp C, Schrader M, Ocker M, Preissner R, Lein M, et al. Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2010;103:18–28, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605725>.