

Papel de *Sox9*, *miR-17-92* y sus parálogos en la
función testicular



Alicia Hurtado Madrid

Tesis Doctoral

julio de 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Alicia Hurtado Madrid
ISBN: 978-84-9163-951-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52508>

El presente trabajo se ha desarrollado en los laboratorios del Departamento de Genética y del Instituto de Biotecnología en la Facultad de Ciencias y en el Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada. La investigación realizada ha sido financiada por la Junta de Andalucía, mediante la concesión de una beca predoctoral. Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía, a través del Programa de Ayudas a Grupos de Investigación (Grupo PAI BIO-109) y de un Proyecto de Excelencia (P11-CVI-7291).

Parte de los resultados desta tesis han sido publicados en las revistas eLife <https://doi.org/10.7554/eLife.15635> y PLoS One <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0197685> y presentados en XL Congreso de la Sociedad de la Sociedad Española de Genética, en el 1st European Symposium on Sex Determination in Vertebrates y en las I Jornadas Científicas del Centro de Investigación Biomédica.

Dedicado a mi madre
y a mis hermanos

Contents

Abstract	1
1 Introducción	19
1.1 Determinación sexual y desarrollo gonadal	19
1.1.1 Gónada bipotencial	20
1.1.2 Desarrollo testicular	24
1.1.3 Desarrollo ovárico	27
1.2 Genes Sox	30
1.2.1 <i>Sox8</i> , <i>Sox9</i> y <i>Sox10</i> en el desarrollo testicular	32
1.3 Antagonismo masculino/femenino	34
1.4 Barrera hemato-testicular	37
1.5 Micro-RNAs	38
1.5.1 Biogénesis de los miRNAs	39
1.5.2 miRNAs y desarrollo gonadal	40
1.5.3 <i>miR-17-92</i> (MirC1) y <i>miR106b-25</i> (MirC3)	46
1.6 Mutagénesis dirigida CRE-LoxP	51
2 Objetivos	55

3	Material y Métodos	57
3.1	Material analizado	57
3.1.1	Líneas transgénicas y protocolo de cruces	57
3.1.2	Marcaje de ratones	59
3.2	Métodos	59
3.2.1	Obtención de tejidos	59
3.2.2	Métodos histológicos	60
3.2.3	Métodos inmunológicos	64
3.2.4	Métodos de análisis molecular	70
3.2.5	Recuento de espermatozoides del epidídimo	79
3.2.6	Análisis de testosterona	80
3.2.7	Administración del Tamoxifeno	81
3.2.8	Tratamiento con WIN 18446	82
3.2.9	Preparación de soluciones	82
3.2.10	Procesamiento de datos RNA-seq	87
3.2.11	Procesamiento de datos del microarray	97
3.2.12	<i>Circos plot</i>	107
4	Resultados	109
4.1	Papel de <i>Sox9/8</i> en el testículo adulto	109
4.1.1	<i>Sox9/8</i> : integridad del testículo	109
4.1.2	Estado funcional en <i>Sox9/8</i> SC-DKO	118
4.1.3	Reprogramación genética testículo-ovario	124
4.1.4	Transdiferenciación Sertoli-granulosa	134
4.1.5	<i>Dmrt1</i> y transdiferenciación	137
4.1.6	SOX8/9 y apoptosis	143
4.2	Función de miR-17-92 en el testículo	145
4.2.1	Generación de mutantes <i>miR-17-92</i>	145
4.2.2	SC- <i>miR-17-92</i> KO: células somáticas y germinales	145
4.2.3	Alteración del transcriptoma testicular	149
4.3	<i>miR-106b-25</i> en la función testicular	159
4.3.1	Oligozoospermia	159

5	Discusión	173
5.1	Papel de <i>Sox9/8</i> en el testículo adulto	173
5.1.1	La batalla de los sexos	173
5.1.2	Papel de SOX9/8 en la función testicular	176
5.1.3	Modelo	179
5.2	Función de <i>miR-17-92</i> en el testículo	181
5.2.1	Alteración del transcriptoma testicular	181
5.3	<i>miR-106b-25</i> en la función testicular	185
5.3.1	Alteraciones en la Espermatogénesis	185
6	Conclusiones	191
6.1	Conclusiones	191
A	Apéndices	197
A.1	Asignación de genes a tipos celulares	197
A.2	Tablas para <i>Circos plot</i>	200
A.3	Construcción de <i>Circos plot</i>	205
A.3.1	Ejemplo de datos para <i>Heatmap</i>	205
A.3.2	Ejemplo de enlaces	210
A.3.3	Documento html maestro	219
	Bibliografía	221

List of Figures

1.1	Biogénesis de los miRNAs	41
1.2	Miembros del <i>cluster miR-17-92</i> , sus parálogos y familias	48
1.3	Sistema CRE/LoxP	52
4.1	Administración de TX:	110
4.2	Eficiencia de recombinación CRE en ratones SC-DKO	111
4.3	Redundancia <i>Sox8/9</i>	114
4.4	Fenotipo testicular en SC-DKO:	118
4.5	Estado funcional de SC y GC en SC-DKO	121
4.6	Estado funciones de la BTB en testículos <i>Sox9/8</i> SC-DKO	123
4.7	Marcadores de Leydig adultas	123
4.8	Expresión de <i>Foxl2</i> en SC-DKO	124
4.9	Feminización del transcriptoma testicular:	127
4.10	<i>Heatmaps</i>	129
4.11	Dendrograma de réplicas y condiciones:	131
4.12	Distancias de JS	131
4.13	Reprogramación de las células somáticas:	132
4.14	Expresión de FOXL2 en células somáticas:	135
4.15	Función de <i>Dmrt1</i>	138

4.16	<i>Sox9</i> vs. <i>Dmrt1</i>	141
4.17	WIN 18 446 y transdiferenciación Sertoli-granulosa	142
4.18	Apoptosis en SC-DKO	143
4.19	Apoptosis en SC-DKO:	144
4.20	Mutantes <i>miR-17-92</i> específicos de SC	146
4.21	Fenotipo testicular en SC- <i>miR-17-92</i>	148
4.22	Marcadores somáticos y germinales	149
4.23	Estudio de la BTB	151
4.24	Estudio de la apoptosis	152
4.25	Clusterización en SC- <i>miR-17-92</i> KO y controles	153
4.26	Gráfico de dispersión de DE	154
4.27	Análisis GO de ratones SC-miR-17-92 KO	155
4.28	Asignación de genes a tipos celulares	157
4.29	Enriquecimiento en términos GO	158
4.30	Análisis morfológico de los testículos <i>miR-106b-25^{-/-}</i>	160
4.31	Fenotipo testicular de ratones <i>Mir-C3</i> KO	161
4.32	Espermatogénesis en ratones <i>miR-106b-25^{-/-}</i>	163
4.33	Apoptosis en los testículos <i>Mir-C3</i> KO	164
4.34	Inmunofluorescencia DMC1/TUNEL	165
4.35	Testosterona vs. peso SV	166
4.36	Clusterización jerárquica	167
4.37	Plot de dispersión	168
4.38	Análisis de términos GO	169
4.39	Interacciones proteína-proteína	170
4.40	Genes diana	171
4.41	Posición del gen <i>Ubc</i>	172
5.1	Modelo	180

List of Tables

3.1	Anticuerpos primarios utilizados	66
3.2	Anticuerpos secundarios utilizados	67
3.3	Cebadores para el genotipado de transgénicos	73
3.4	Cebadores utilizados para RT-Q-PCR	77
4.1	Características morfológicas de mutantes <i>Sox9/8</i>	113
4.2	Morfología testicular en <i>Sox9/8</i> DKO	117

Abreviaturas

ABHD5: Abhydrolase domain containing 5

ACTA2: α -actina del músculo liso

AGO: Argonauta

AMH: Hormona antimulleriana o *Mis*

ATG7: Autophagy related 7

BAC: Bacterial artificial chromosome

BMP2: Bone morphogenetic gene 2

BTB: Barrera hemato-testicular

CBLN4: cerebellin-4 precursor

CBX2: Chromobox homolog 2 o *M33*

CD: Displasia campomélica

CDS: CoDing Sequence

Cldn11: Claudina 11

COX20: Cox2 chaperone homolog

CTNNB1: β -catenina

CYP19A1: Aromatasa

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

datx: Días después del inicio del tratamiento con tamoxifeno

DE: Genes expresados diferencialmente

DGCR8: Proteína 8 de la región de DiGeorge

DKO: Doble knockout

DMC1: DNA meiotic recombinase 1

DMRT1: Doublesex and Mab-3 related transcription factor 1

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DSD: Disorders of sex development

dsRBD: double-stranded RNA-binding

DUSP10: Dual specificity phosphatase 10

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

Eif5b: Eukaryotic translation initiation factor 5B

EMX2: Empty spiracles homeobox 2

Ex: Día embrionario x

EXP5: Exportin-5

EYFP: Enhanced yellow fluorescent protein

FGF9: Fibroblast growth factor 9

FOG2: Friend of GATA2

FOXL2: Forkhead box L2

FST: Folistatina

GATA2: GATA binding protein 2

GATA4: GATA binding protein 4

GC: Células germinales

GO: Gene Ontology

H-E: Hematoxilina-eosina

HMG: High-mobility group

Hsd3b1: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase

ING2: Inhibitor of growth family, member 2

Insl3: Insulina-like 3

KO: Knockout

KPNA2: Karyopherin (importin) alpha 2

LAMININ: Laminina

LAMTOR1: Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator 1

LHX9: LIM homeobox 9

LNA: Locked Nucleic Acid

LOF: Pérdida de función

LoxP: Locus of X-over of P1

M33: Mouse Polycomb group member M33 o *Cbx2*

MEC: Matriz extracelular

Mir-C3 KO: *miR-106b-25^{-/-}*

MIR17HG: miR-17-92 cluster host gene

MirC1: miR-17-92

MirC3: miR-106b-25

miRNA: micro-RNA

MIS: Mullerian-inhibiting substance

mRNA: RNA mensajero

NLS: Señal de localización nuclear

NR5A1: Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 o *Sf1*

P450sc: Cholesterol side-chain cleavage enzyme

pb: pares de bases

PBS: Phosphate-buffered saline

PBST: Phosphate-buffered saline + Tween20

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PGC: Células germinales primordiales

PGK2: Phosphoglycerate kinase 2

PM: Células mioides peritubulares

pre-miRNA: miRNA precursor

pri-miRNA: miRNA primario

Px: Día postnatal x

RA: Ácido retinoico

RBE: Recombinase binding element

RISC: o mRISC, complejo de silenciamiento inducido por miRNAs

RNA: Ácido ribonucléico

RPKM: Lecturas por kilobase por millón

RSPO1: R-spondin 1

RT: Room temperature

SC-miR-17-92 KO: *Amh-Cre;miR-17-92^{flox/flox}*

SC-DKO: Doble knockout específico de células de Sertoli

SC: Células de Sertoli

SF1: Steroidogenic factor 1 o *Nr5a1*

SIK1: Salt inducible kinase 1

siRNA: small interfering RNA

SIX1/4: Sine oculis homeobox homolog 1 and 4

SLC30A3: Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3

SLC9A1: Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 1

SOX: SRY-related HMG box

SOX8: SRY-related HMG box, gene 8

SOX9: SRY-related HMG box, gene 9

***Sox9/8* SC-DKO (Sox9):** *Sox9-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*

***Sox9/8* SC-DKO (Wt1):** *Wt1-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*

***Sox9/8* SC-DKO:** *Wt1-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}* y *Sox9-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*

SOX10: SRY-related HMG box, gene 10

SRY: Sex determining region Y

SSC: spermatogonial stem cells

STK38: Serine/threonine kinase 38

STRA8: Stimulated by retinoic acid 8

SV: Vesícula seminal

TAE: Tris-acetato-EDTA

TCF/LEF: Transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor

TES: Testis-specific enhancer of Sox9

TESCO: core testis-specific enhancer of Sox9

TNAP: Tissue nonspecific alkaline phosphatase

tRNA: RNA transferente

TSS: Translation start site

TX: Tamoxifeno

UBC: Ubiquitina C

UTR: región no transcrita

VNN1: Vanin-1

WNT4: Wingless-type MMTV integration site family member 4

WT1: Wilms' tumor 1 suppressor gen 1

X⁻: alelo delecionado

X^f: alelo floxeadado

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Abstract

Role of *Sox9*, *miR-17-92*, and their paralogs in the testicular function

Introduction

Gonadal development and maintenance

Infertility is a growing global problem that affects both men and women. It is estimated that approximately 15-20% of all couples experience infertility at some point in their reproductive lives and approximately half of the cases are of male origin. Factors that can affect a man's reproductive capacity include sperm problems, hormonal disorders, genetic abnormalities, diseases and infections of the male reproductive system. Thus, the understanding of the physiological, endocrine, and genetic processes involved in the development and function of the gonads, and the regulation of sex hormones production will help to design therapeutic strategies to overcome these reproductive disorders. Since the discovery of the Y-linked, mammalian sex determining gene, *SRY*, the scientific community has made significant findings to uncover the genetic basis of sex determination, sex differentiation and sex function. Although a substantial progress has been made in this field, the current situation is still far from having a full understanding of this processes, and thus, additional effort is needed to elucidate new genetic mechanisms underlying gonadal processes.

It is known that the presence of a Y chromosome determines the male sex in mammals, while its absence leads to female development.

Initially, the gonad is bipotential, which means that can develop as either testis or ovary. The decision as to which fate to follow depends on the presence/absence of sex-specific factors. In the male, *SRY* upregulates *SOX9* which triggers testis differentiation, whereas in the female, the *WNT*/ β -*catenin* signaling pathway becomes active and induces ovarian development (Sekido & Lovell-Badge, 2008, 2013; Svingen & Koopman, 2013). Both pathways antagonize each other: the loss of either *SRY* or *SOX9* leads to the formation of XY ovaries (Berta *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994) and the absence of *WNT*-signaling molecules such as *WNT4* or *RSPO1* causes XX sex reversal (Vainio *et al.*, 1999; Parma *et al.*, 2006). Similarly, gain-of-function experiments confirmed this antagonism, as either upregulation of the testis promoting genes *Sox9* or *Dmrt1* in the XX bipotential gonad (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2015) or ectopic activation of the canonical *WNT* signaling pathway in the XY bipotential gonad (Maatouk *et al.*, 2008a) leads to XX and XY sex reversal, respectively. Furthermore, Sertoli cell-specific conditional inactivation of *Sox9* on a *Sox8*^{-/-} background at embryonic day 13.5 (E13.5), two days after the sex determination stage, leads to *Dmrt1* downregulation with upregulation of the ovarian-specific genes *Wnt4*, *Rspo1* and *Foxl2* (Barrionuevo *et al.*, 2009; Georg *et al.*, 2012). Similarly, Sertoli cell-specific ablation of *Dmrt1* at the same stage (E13.5) results in ectopic expression of *Foxl2* by postnatal day 14 (P14) and to *Sox9* downregulation by P28, including male-to-female genetic reprogramming, as revealed by mRNA profiling (Matson *et al.*, 2011a). Again, gain-of-function experiments confirmed the existence of sexual antagonism after the sex determination period, as conditional stabilization of β -catenin in differentiated embryonic Sertoli cells (E13.5, *Amh-Cre*) resulted in testis cord disruption (Chang *et al.*, 2008). The male-vs-female genetic antagonism also persists in the adult ovary. The finding that in adult fertile females granulosa cells transdifferentiate into Sertoli-like cells after *Foxl2* ablation revealed that terminally differentiated female somatic cells require permanent repression of the male-promoting factors to maintain correct identity and function (Uhlenhaut *et al.*, 2009). Furthermore, transgenic expression of *Dmrt1* in the adult ovary silenced *Foxl2* and transdifferentiated granulosa cells into Sertoli-like, *Sox9*-expressing cells (Lindeman *et al.*, 2015). Regarding the

adult testis, a similar phenomenon appears to occur in fully functional Sertoli cells after *Dmrt1* ablation (Matson *et al.*, 2011a). In addition to cells with a Sertoli cell morphology expressing both SOX9 and FOXL2, some cells with typical granulosa cell features were also observed, including the absence of SOX9 and the presence of FOXL2. However, Sertoli-to-granulosa cell transdifferentiation was not unambiguously documented, as the authors used an inducible ubiquitous promoter (*UBC-CreERT2*) for *Dmrt1* ablation in adult Sertoli cells and the possible existence of genetic reprogramming was not investigated as no mRNA profiling was performed in adult mutant testes.

Sox genes encode an important group of transcription factors with relevant roles in many aspects of pre- and postnatal development of vertebrates and other animal taxa. There are 20 *Sox* genes in vertebrates, which are classified into 9 groups. *Sox8*, *Sox9*, and *Sox10* (SoxE group) are involved in many developmental processes (Lefebvre *et al.*, 2007). All three SoxE genes are expressed during testis development, *Sox9* being essential for testis determination and *Sox9/Sox8* necessary for subsequent embryonic differentiation (Chaboissier *et al.*, 2004; Barrionuevo *et al.*, 2006, 2009). *Sox10* can substitute for *Sox9* during testis determination (Polanco *et al.*, 2010).

Nothing is known on the role of SOX9 in the adult testis, where it is expressed by Sertoli cells in a spermatogenic stage-dependent manner in several mammalian species (Fröjdman *et al.*, 2000; Dadhich *et al.*, 2011; Massoud *et al.*, 2014). Here we report the use of two Sertoli-cell-specific Cre lines (*Wt1-CreERT2* and *Sox9-CreERT2*) to induce *Sox9* ablation on a *Sox8*^{-/-} background in the adult testis, starting at postnatal day 60 (P60). We show that *Sox9/8* Sertoli cell-specific knockout (SC-DKO) testes undergo testis-to-ovary genetic reprogramming and Sertoli-to-granulosa cell transdifferentiation. The process is retinoic acid (RA)-mediated and occurs as a consequence of *Dmrt1* downregulation. SOX9/8 are necessary to maintain *Dmrt1* expression and thus to prevent *Foxl2* expression in the adult testis. Furthermore, double mutant testes exhibited complete degeneration of the seminiferous tubules and increased apoptosis, indicating that SOX9/8 are continually required for the maintenance of testis integrity.

Role of microRNAs in testicular differentiation and function

Micro-RNAs (miRNAs) are a family of small non-coding RNAs (~22 nucleotides) that regulate gene function at the post-transcriptional level by either preventing protein translation and/or promoting mRNA degradation (Siomi & Siomi, 2010). The *miR-17-92* cluster, also known as *MirC1*, is a polycistronic miRNA gene encoding six members (*miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-20a*, *miR-19b-1* and *miR-92-1*) which are highly conserved in vertebrates and expressed in practically all tissues analyzed during embryonic and postnatal stages (Ventura *et al.*, 2008). In human and mouse, two paralog clusters exist, i.e. the *miR-106a-363* cluster comprising 6 miRNAs (*miR-106a*, *miR-18b*, *miR-20b*, *miR-19b-2*, *miR-92a-2* and *miR-363*) and the *miR-106b-25* one with 3 members (*miR-106b*, *miR-93* and *miR-25*). The *miR-17-92* cluster is a potent oncogene and it has been associated to several types of both hematopoietic cancers such as B-cell lymphomas, B-cell chronic lymphocytic leukemia and T-cell lymphoma, and solid cancers including retinoblastoma, pancreatic cancer and breast cancer, among others (Mogilyansky & Rigoutsos, 2013). The *miR-17-92* cluster plays also important roles during development. Hemizygous deletions of *MIR17HG*, the *miR-17-92* cluster host gene, have been associated to the Feingold syndrome, an autosomal dominant condition characterized by multiple skeletal abnormalities. Homozygous *miR-17-92* null mutant mice died perinatally due to lung defects and cardiac hypoplasia (Ventura *et al.*, 2008) and partially phenocopied some skeletal abnormalities of the Feingold syndrome (de Pontual *et al.*, 2011). This miRNA cluster was also shown to play a role in B- and T-cell development (Ventura *et al.*, 2008), neural stem cell differentiation (Bian *et al.*, 2013), and orofacial clefting (Wang *et al.*, 2013a).

Several studies have shown that the members of the *miR-17-92* cluster are expressed in germ cells (GCs) of the testis and conditional inactivation of the cluster in either embryonic GCs or the whole adult testis resulted in spermatogenic defects (Tong *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2016). The Sertoli cell-specific deletion of the RNase III enzyme Dicer in mice revealed that miRNAs also play an important role in the development and survival of Sertoli cells (SCs) (Papaioannou *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). Several studies have provided evidence that the members of the *miR-17-92* cluster are expressed in SCs. All the members of the cluster were cloned from

purified P6 SCs (Papaioannou *et al.*, 2009), in situ hybridization with LNA (Locked Nucleic Acid) on adult testes showed *miR-17* and *miR-20a* expression in SCs (Tong *et al.*, 2012), and ulterior analysis of the small RNA transcriptome of SCs purified from mice at postnatal day 6 revealed high levels of expression for *miR-19a* and *miR-19b*, intermediated levels for *miR-17* and *miR-20a* and low levels for *miR-18a* and *miR-92a* (Ortogerio *et al.*, 2013).

Overall, available data show that miRNAs are required for normal development of SCs and that *miR-17-92* expression in GCs plays a role in spermatogenesis maintenance, but nothing is currently known on the role of this miRNAs cluster in postnatal and adult SCs. In order to overcome the postnatal lethality of *miR-17-92*^{-/-} mice and to uncover novel functions for *miR-17-92* during SC development, we conditionally deleted the *miR-17-92* cluster in embryonic SCs shortly after the sex determination stage using an *Amh-Cre* allele.

We have also studied the role of the *miR-106b-25* cluster on testis differentiation and function. *miR-106b-25* Knockout mice are fertile and no testicular phenotype have been described (Ventura *et al.*, 2008). The reason for this is probably because nobody has studied testis development in these mice. We have performed a detailed analysis of the testicular function of *miR-106b-25*^{-/-} and found that they show altered spermatogenesis and reduced number of spermatozoa.

Objectives

We have 3 major objectives:

1. To study of the role of *Sox9* and *Sox8* in adult testes
2. To identify the role of the *miR-17-92* cluster in Sertoli cell development and function
3. To analyze the development and function of *miR-106b-25*^{-/-} testes.

Material and Methods

Sox9 and Sox8 in adult testes

Mice and histological methods Previously generated *Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}* mice (Barrionuevo *et al.*, 2009; Kist *et al.*, 2002; Sock *et al.*, 2001) were bred to *Wt1-CreERT2* mice (Zhou *et al.*, 2008) and the resulting double heterozygous offspring harboring the Cre allele was backcrossed to *Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}* mice to obtain heterozygous and homozygous compound *Sox9/Sox8* conditional mutants. The same mating scheme was followed with the *Sox9-CreERT2* mouse line (Kopp *et al.*, 2011). To report CRE activity, the *R26R-EYFP* reporter allele (Srinivas *et al.*, 2001) was crossed into *Wt1-CreERT2* and *Sox9-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}* mice. For genotyping we performed PCR and qPCR with DNA purified from tail tips. Tamoxifen (Sigma, T5648) dissolved in corn oil (Sigma, C8267) at a concentration of 30 mg/ml and 0.16 mg of TX per gram of body weight was initially administered. Other animals were treated with a TX-supplemented diet (40 mg TX/100 g Harlan 2914 diet) for one month. Histological and immunohistological methods were performed according to standard protocols.

Transcriptome analysis Testes were extracted from six P150 (90 days after tamoxifen treatment; datx) mutant males (three *Wt1-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}* and three *Sox9-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*). As controls, both gonads were also extracted from two P150 (not treated) and two P150 (90 datx) *Sox9^{f/f}* male mice as well as from two 4–5 months old normal females. All TX-treated mice were euthanized three months after the initiation of diet TX-treatment for one month. The two gonads of each individual were pooled and the total RNA were then individually purified from the twelve samples using the Qiagen RNeasy Midi kit following the manufacturer’s instructions. After successfully passing the MacroGen Inc. (Seoul, South Korea) quality control, the twelve RNA samples were paired-end sequenced separately in an Illumina HiSeq 2000 platform at MacroGen and the quality of the resulting sequencing reads was assessed using FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>).

Bioinformatics RNAseq data were processed with the Tuxedo tools (Trapnell *et al.*, 2012). Alignments were done with Tophat/Bowtie2

against the mm10 UCSC annotated mouse genome. Differential expression analyses were done with Cuffdiff. Analysis of the resulting data were performed with the CummeRbund Bioconductor package. The quality of RNA-seq was checked as described in the package documentation. Briefly, by comparing FPKM scores across samples, and looking for outliers replicates, by analyzing squared coefficient of variation which allows visualization of cross-replicate variability between conditions and by analyzing the dispersion plots.

miR-17-92 cluster in Sertoli cell development and function

Mice and histological methods To induce SC-specific deletion of miR-17-92, we mated mice with a floxed allele of miR-17-92 (Ventura *et al.*, 2008) to mice harbouring the SC-expressed transgene *Amh-Cre* (Holdcraft & Braun, 2004) obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA; Stock No: 007915 and 008458, respectively). They were bred in our animal house facilities and the resulting double heterozygous offspring carrying the Cre allele was backcrossed to homozygous *miR-17-92^{flox}* mice to obtain *Amh-Cre;miR17-92^{flox/flox}* mice. To evaluate Cre-activity, *Amh-Cre* and *Amh-Cre;miR17-92^{flox/flox}* mice were bred with the Cre-reporter mouse line *R26R-LacZ* (Soriano, 1999) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA; Stock No: 003309). Primers and PCR conditions for *miR-17-92^{flox}* and for R26R-EYFP and Cre have been previously described. Mice with genotype *miR17-92^{flox/flox}* lacking the Cre allele were used as controls. All animal experiments in this study were approved by the University of Granada Ethics Committee for Animal Experimentation (exp. No: 2011–341), and were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations dictated by this Committee.

Apoptotic cells were labelled using the Roche TUNEL kit (Fluorescent In Situ Cell Death Detection Kit) according to the manufacturer’s instructions.

An *in vivo* test was performed to study the permeability of the blood-testis barrier (BTB) in the testes of control and mutant mice. For this, we used a biotin-labelled tracer compound (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin tracer, Thermo Scientific) as described (Dadhich *et al.*, 2013).

Transcriptome analysis

Total RNA was isolated from three *Amh-Cre;miR17-92^{fllox/fllox}* and three control (*miR17-92^{fllox/fllox}*) testes at postnatal day 60 (P60) using the Qiagen RNeasy Midi kit following the manufacturer's instructions. Subsequently, the six RNA samples were sent to MacroGen Inc. RNA samples were checked for quality and libraries were prepared using TrueSeq RNA Sample Prep Kit V2 and they were paired-end sequenced separately in an Illumina HiSeq 4000 platform, generating between 120 and 135 million reads per sample.

Bioinformatics The RNA-seq reads were mapped to the UCSC mm10 mouse genome using the STAR RNA-seq aligner (version 2.5)(Dobin *et al.*, 2013), and subsequently they were counted with the featureCounts function from the R subread package. Only genes with 5 or more RPKM (reads per kilobase per million) in at least two of the samples were considered to be expressed and were used for further analysis. Analysis of differential gene expression was performed with edgeR.

Development and function of miR-106b-25^{-/-} testes

We used previously generated *miR-106b-25^{-/-}* mice (Ventura *et al.*, 2008), and the same matting strategy and technical procedures described above.

Results

Sox8/9 in adult testes

At the histological level, TX-treated controls were similar to untreated males, except between P80 (20 datx) and P120 (60 datx) and mainly at P90 (30 datx), when they showed some degenerating seminiferous tubules, but recovered afterwards. Testes in *Sox9/8* DKO (*Sox9*) mice were similar to the TX-treated controls at P70 (10 datx) except for a few testis tubules with enlarged lumen. At P80 (20 datx), only few seminiferous tubules showed signs of degeneration (shrinkage and germ cell depletion), whereas this was more frequent by P90 (30 datx). In many cases, Sertoli cell-only tubules were observed. By P120 (60 datx), tubules had become solid testis cords whose diameter appeared even more reduced at P150

(90 datx). While some mice continued to exhibit this phenotype at P180 (120 datx), a subset of mice in this group was more affected. In these latter mice Sertoli and germ cells had disappeared completely. At later time points, all mice showed this severe testicular phenotype. This progressive degeneration of the testicular phenotype in *Sox9/8* SC-DKO mice was evident when we analyzed the relative abundance of the most relevant testicular morphological features between P70 (10 datx) and P180 (120 datx). In contrast, Leydig cells appeared morphologically normal in mutant testes. *Sox9/8* DKO (*Wt1*) mice exhibited a similar testicular phenotype. These results show that *Sox8* and *Sox9* alleles act redundantly in adult Sertoli cells and are necessary to maintain the integrity of the seminiferous tubules of functional testes.

Regarding the expression of several somatic and germ cell markers, LAMININ, a principal component of the basement membrane persisted in both P150 (90 datx) and P180 (120 datx) testes of SC-DKO mice. Alpha smooth muscle actin (*Acta2*) expressed by both peritubular myoid (PM) cells and arterial muscle fibers was detected in the testes of both TX-treated controls and P150 (90 datx) SC-DKO mice. In contrast, at P180 (120 datx), strong ACTA2 signal persisted in the arteries but that of PM cells was almost undetectable. This shows that acellular cords in severely affected SC-DKO testes have lost not only Sertoli and germ cells, but also PM cells. CLAUDIN 11 is a principal component of tight junctions, the main junctional structures forming the BTB. *Cldn11* (the claudin11 gene) expression was similar between controls and double mutants before P150 (90 datx) (not shown), but it was severely reduced by P150 (90 datx) and completely absent in P180 (120 datx) *Sox9/8* mutant testes, indicating that the BTB is not functional in these testes. We also performed immunofluorescence for both PCNA, which is expressed in mitotic spermatogonia as well as in zygotene and early pachytene, but not leptotene spermatocytes, and DMC1, a meiotic recombination protein marking zygotene-pachytene spermatocytes. At P60 (30 datx), most mutant seminiferous tubules exhibited a clear reduction of spermatogenic activity and some spermatocytes were abnormally located in the inner region of the tubules and not at the periphery, as seen in TX-treated control testes. In P120 (60 datx) testes, spermatocytes were scarce and only proliferating spermatogonia were seen in most testis tubules, while at

P150 (90 datx), both spermatogonia and spermatocytes had disappeared in most tubules. Unlike other somatic cells, Leydig cells appear not to be seriously affected in testes from Sox9/8 SC-DKO mice. These cells do not transdifferentiate into theca cells, as they never express *Foxl2* (as theca cells do), and maintain the steroidogenic function for a long time after *Sox9* ablation, as deduced from the expression of P450scc, a cytochrome involved in the synthesis of testosterone. Consistently, the testosterone-producing enzyme HSD17b3 and the marker for adult functional Leydig cells *Insl3* are expressed at high levels in the mutant testes.

Analysis of *Foxl2* expression revealed that by P105 (45 datx), FOXL2-positive cells were present in almost all testis cords, and by P150 (90 datx), the most severely affected mice showed many FOXL2-positive cells within almost all testis cords.

Genome-wide transcriptome analysis of P150 untreated control testis, P150 (90 datx) control and mutant testis and control ovary showed that SC-DKO testes exhibit a striking feminization of the testicular transcriptome. We found 12 380 genes with significant differential expression between the five sample conditions. With the exception of a few gene clusters, most genes in mutant testes adopted an ovary-like expression pattern. Expression heat maps for selected 39 ovarian somatic cell-specific genes and 33 oocyte-specific genes selected using bioGPS (<http://biogps.org>) revealed that the cell reprogramming observed in the SC-DKO testes only affects somatic cells. Notably, bar plots for six genes known to be adult granulosa cell markers showed that these genes were upregulated in the mutant Sertoli cells, revealing an ovary-like expression pattern. In addition, within the seminiferous cords of SC-DKO testes we found a few FOXL2⁺ cells expressing the enzyme aromatase.

miR-17-92 in Sertoli cells

SC-*miR-17-92* KO mice were fertile and provided litters of apparently similar size than controls. At P60 we found no statistically significant difference between the testis mass of SC-*miR-17-92* KO and controls. Histologically, 2 months old mutant testes were similar to controls showing seminiferous tubules of the same size and completing the spermatogenic cycle. Consistently, the epididymal tube was full of spermatozoa and

epididymal sperm counts showed no difference between both conditions. The same situation persisted in one year old mutant mice: 1) they were fertile, 2) showed no difference in testis mass when compared to controls, 3) their testes showed normal spermatogenesis, 4) their epididymal tubes were full of spermatozoa, and 5) their epididymal sperm counts were similar to those of controls.

Next, we studied the expression of several somatic and GC markers by immunofluorescence. SOX9 and WT1, two transcription factors expressed in adult SCs, are necessary for testis function and maintenance. Both control and SC-*miR-17-92* mutant testes exhibited the same expression pattern for the two proteins in SCs. PCNA is expressed in mitotic spermatogonia as well as in zygotene and early pachytene spermatocytes and the meiotic recombination protein, DMC1, is expressed in early spermatocytes (leptotene-pachytene). No difference between mutant and control testes was observed in the expression patterns of these two proteins at both P60 and P365 stages. Also, LAMININ, a component of the basement membrane, and α -smooth muscle actin (ACTA2), a marker of peritubular myoid cells and arterial muscle fibers, showed similar expression in the two study groups. Likewise, the expression of P450scc, a steroidogenic cytochrome expressed in Leydig cells, was also similar in both SC-*miR-17-92* KO and control testes. In addition, CLAUDIN 11 (*Cldn11*), a major component of the tight junctions forming the BTB, did not show a different pattern of expression between the control and mutant condition. Consistently, injection of a biotin tracer showed that the BTB in mutant males was impermeable, as observed in control testes. Finally, TUNEL assay showed no increase in the frequency of apoptotic cells in SC-*miR-17-92* KO testes compared to control ones.

We also performed RNA-seq experiments on the adult testes of three SC-*miR-17-92* KO and three control males at postnatal day 60. The differences between the expression profiles of these samples were examined using a hierarchical clustering analysis. Replicate samples from the same condition clustered together, indicating that the whole testis transcriptome is significantly and consistently altered when *miR-17-92* is deleted in SCs. To confirm this, we checked the presence of differentially expressed (DE) genes when comparing the two experimental conditions, and found 809 genes deregulated at P adjusted (FDR) < 0.01 (418 upregulated and

391 downregulated). Smear plot of the differential expression test showed that the vast majority of the DE genes were deregulated by less than 2 times, indicating that, despite a reproducible deregulation of many genes, the magnitude of the change was generally moderate. Gene ontology (GO) analysis of DE genes revealed a significant enrichment (P adj. < 0.05) in terms related to normal testicular functions including spermatogenesis, meiotic cell cycle, chromosome segregation, cell-cell adhesion, cell-projection, and DNA-repair, among others. Interestingly, although we deleted *miR-17-92* specifically in SCs, several GO terms referred to processes normally occurring in GCs (e.g. spermatid development and meiotic cell cycle), indicating that the GC transcriptome was also altered in the mutant mice.

Development and function of miR-106b-25^{-/-} testes

We found a 30% reduction of the testis mass and a 40% reduction in the sperm epididymal content of the *Mir-C3* KO mice. We also studied the testis phenotype at the histological level. For this we used the Johnsen score, which is a standard method to assess spermatogenesis. In this system testis tubules are sort out according to their appearance. Thus, a normal tubule containing sperm is given a score of 10 and a Sertoli cell only tubule is given a score of 0. We counted more than 100 tubules in 3 testes of each condition and we obtained an average Johnsen score of 9.2 in control testes with most of the tubules with a JS between 8 and 10. In contrast in *Mir-C3* KO we obtained an average JS of 7.5, with the vast majority of the tubules with a JS between 7 and 8. In the mutants we observed some degenerated tubules with a JS of 4, an observation not found in the controls. Sertoli cell markers including *Sox9* and *Wtl* had a normal expression pattern in mutant testes. We also checked DMC1, a marker of leptotene to pachytene spermatocytes that is expressed only in some stages of the spermatogenic cycle. In both control and mutants we found a similar pattern of positive and negative DMC1 tubules. However, we observed that the percentage of DMC1 positive tubules was almost two fold in the mutant when compared to the control. We also found a significant increased in the number of apoptotic cells in *Mir-C3* deleted testes. To identify dying cells, we performed double immunofluorescence for DMC1 and TUNEL and observed that TUNEL-

stained cells frequently exhibited a weak staining for DMC1. Next we perform a RNA-seq analysis of mutant and control testes, and after mapping the reads we made a clustering analysis of the individual samples. We saw that replicate samples of the same condition clustered together, indicating that there is a significant and consistent alteration of the testis transcriptome when *MirC3* is deleted. We found 2 255 genes deregulated at a FDR < 10%. 1 068 were upregulated and 1 187 were downregulated. The smear plot comparing the fold change in expression with the average expression showed that the vast majority of the DE genes are deregulated by less than two times, indicating that although there is a reproducible deregulation of many genes, the magnitude of this change is quite modest. Next, we performed a Gene Ontology analysis of the differentially expressed genes and we saw that the 30 most significantly enriched GO classes could be grouped in three general categories: Cell cycle and reproduction, Microtubule process, and ubiquitination and catabolism.

Discussion

Sox8/9 in adult testes

There is now compelling evidence that the bipotential nature of the genital ridge at the beginning of gonad development is not completely lost once either testes or ovaries acquire their final adult morphology and functionality. During embryonic development the newly formed Sertoli cells can transdifferentiate to their ovarian counterparts when the testis promoting factors *Sox9* or *Dmrt1* are lost (Georg *et al.*, 2012; Matson *et al.*, 2011a). The finding that *Foxl2* in the adult ovary was necessary to prevent granulosa-to-Sertoli cell transdifferentiation revealed that this antagonism also operates in the adult gonad. In the adult testis, the same antagonism also appears to exist, as FOXL2⁺ cells were observed when *Dmrt1* was ubiquitously deleted (Matson *et al.*, 2011a). Here we show that Sertoli-to-granulosa cell transdifferentiation can be induced as well in the adult mouse testis by just deleting two *SoxE* genes, *Sox9* and *Sox8*. These results evidence that *Sox9* has a crucial role, not only during sex determination and testis differentiation, but also in adult testis maintenance, where, together with *Sox8* and coordinately with *Dmrt1*, it prevents male-to-female genetic reprogramming.

The regulatory relationship between *Dmrt1* and *Sox9* requires further discussion. At the sex determination stage of the mouse (E11.5), both *Sox9* and *Dmrt1* are expressed in the early embryonic testis (Kent *et al.*, 1996; Raymond *et al.*, 1999), but whereas early embryonic *Sox9* mutants show sex reversal (Chaboissier *et al.*, 2004; Barrionuevo *et al.*, 2006), early embryonic *Dmrt1* KO mice have testes that express *Sox9* and appear histologically normal until P7 (Raymond *et al.*, 2000). Thus, *Sox9* expression is independent of DMRT1 during the sex determination stage and some time thereafter. Similarly, Sertoli cell-specific inactivation of *Sox9/8* at E13.5, shortly after the sex determination stage, leads to a rapid downregulation of *Dmrt1* that becomes already visible four days later, at E17.5 (Georg *et al.*, 2012). In contrast, *Dmrt1* ablation at E13.5 results in a very delayed *Sox9* downregulation, which is seen at P14 (one month later), coinciding with *Foxl2* upregulation (Matson *et al.*, 2011a). This suggests again that *Sox9* expression is independent of *Dmrt1* in newly differentiated Sertoli cells and that the loss of *Sox9* after *Dmrt1* ablation is a secondary consequence of the upregulation of ovarian genes(s), such as *Foxl2*, in the same cells. On the other hand, several observations suggest the transactivation of SOX9 by DMRT1: 1) DMRT1 binds near the *Sox9* locus in P28 mouse testes (Matson *et al.*, 2011a), 2) ectopic expression of *Dmrt1* in embryonic XX gonads causes XX sex reversal with upregulation of *Sox9* (Zhao *et al.*, 2015) and 3) FOXL2^{-/-} sex reversed polled goats undergo a process of transdifferentiation in which DMRT1 expression precedes the upregulation of SOX9 (Elzaiat *et al.*, 2014). In the latter two cases, however, female-promoting genes, including FOXL2, are either downregulated or not expressed, and thus, SOX9 upregulation could be again an indirect consequence of the downregulation of female-promoting genes. Here we provide evidence that in the adult gonad, mutant *Sox9/8* Sertoli cells lose DMRT1, and that FOXL2 protein appears concomitant with the loss of DMRT1, consistent with the notion that *Dmrt1* expression is SOX9/8-dependent and that DMTR1 represses *Foxl2*. Additional observations support this view: 1) nearly all the genes strongly affected by the loss of DMRT1 were also affected by the loss of SOX9/8; 2) Sertoli-to-granulosa cell transdifferentiation observed in the testes of our *Sox9/8* mutant mice may be reduced by decreasing levels of RA, a signaling pathway known to be blocked by DMRT1 in Sertoli cells to

prevent *Foxl2* expression and transdifferentiation into granulosa-like cells (Minkina *et al.*, 2014); 3) DMRT1 can silence *Foxl2* in the absence of SOX9 and SOX8 (Lindeman *et al.*, 2015) and 4) *Sox9* is upregulated in the adult ovary after the ectopic expression of *Dmrt1*, coinciding with *Foxl2* downregulation (Lindeman *et al.*, 2015). Altogether, available data suggest that, as observed at earlier stages, a main role for SOX9/8 in adult male sex maintenance is to keep *Dmrt1* actively expressed, this latter gene having a fundamental role in repressing female-specific genes. However, these observations do not rule out the possibility that DMRT1 is also necessary for the maintenance of *Sox9* expression in the adult testis and that a feed-forward regulatory loop between *Sox9/8* and *Dmrt1* exists that ensures testis maintenance and antagonizes the feminizing action of *Foxl2*. Additional experiments (e.g. a time course of *Sox9* expression in adult SC-DKO *Dmrt1* mice) will help to clarify this issue.

mirR17-92 in Sertoli cells

The SC-*miR-17-92* KO adult testes showed apparently normal development and function, even though RNA-seq analyses evidenced consistent deregulation of many testicular genes, indicating that expression of the *mir-17-92* cluster in SCs is necessary to maintain the gene expression levels of the whole testis within normal values. Thus, the question arises as to why such an alteration of the transcriptome homeostasis does not result in an observable phenotype. In this regard, it should be noted that, despite the high number of deregulated genes in SC-*miR-17-92* KO testes, the magnitude of the changes in their expression levels was generally modest (less than twofold in most cases). Such a scenario, implying many deregulated genes showing just moderate changes in their expression levels, has been previously described for *miR-17-92*, and it is consistent with the proposed notion that its members act as fine-tuners of large gene networks rather than as major genetic switches of specific pathways (Han *et al.*, 2015). The phenotypic consequences of transcriptome alterations induced by the absence of *miR-17-92* may be variable and difficult to predict. As an example, despite the fact that the number of deregulated genes in the embryonic tail buds of mice harboring a homozygous deletion for the *miR-17* seed family (*sim500*) was lower than the observed in the same tissue of homozygous mutants for the *miR-19* seed family (*sim700*), skeletal mal-

formations were observed in the former mice (defects in axial patterning regulation), but not in the latter ones. Hence, it appears that the severity of the phenotype derived from the absence the *miR-17-92* cluster depends on the spatial and temporal cellular context. Most importantly, our result evidence that testis homeostasis must be strictly controlled as even when hundreds of genes were deregulated in all testicular cell types of *miR-17-92* KO testes, these showed no evident pathologic phenotype, conserving normal structure and function. Probably many other regulatory factors contribute to maintain testis homeostasis, as the simple ablation of *miR-17-92* is not enough to disturb it significantly. However, it is likely that mutant testes become more sensitive to stressful situations. Consistent with this idea, it was recently reported that hepatocyte-specific *miR-17-92*-deficient mice were fertile and apparently healthy, but their capacity of liver regeneration after tissue injury had resulted significantly reduced (Zhou *et al.*, 2016). Hence, although no obvious testicular phenotype is observed, the transcriptome alteration we detected in our *miR-17-92* mutants might cause a suboptimal testis functional status.

Development and function of miR-106b-25^{-/-} testes

The detailed analysis that we have performed in the murine *miR-106b-25^{-/-}* testes have revealed that a 30% reduction in the testis mass was produced, evidencing that this miRNA cluster plays a role during testis development and/or function. This phenotype is similar to that described for its paralog cluster *miR-17-92* (Tong *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2016). However, in both cases the mutant mice are fertile. This suggests that a redundant function may exist between both clusters. The generation of compound mutant mice will clarify this issue. We are currently generating such mice in our laboratory. To check for the functional status of *miR-106b-25^{-/-}* testes we analyzed the Jonhsen's index, and we found that these testes displayed a mild alteration of the spermatogenesis. In addition, cell death was increased in mutant testis at the spermatocyte level and the meiotic cycle seemed to be slowed down also at the same stage, as shown by DMC1 immunofluorescence. Altogether, these observations indicate that the *miR-106b-25* cluster may have a function in controlling the spermatogenic cycle at the meiotic prophase I stage. We found that more than 2000 genes were deregulated in the mutant testes. As observed in

SC-*miR-17-92* KO testes, the magnitude in the change of the expression for most of the genes was very modest, generally lower than twofold. This again support the notion that the members of this cluster act as fine-tuners of large gene networks rather than as major genetic switches of specific pathways (Han *et al.*, 2015). The GO analysis of the differentially expressed showed that the 30 most significantly enriched GO classes could be grouped in three general categories: Cell cycle and reproduction, Microtubule process, and ubiquitination and catabolism. All of them are normal processes occurring during testicular function. The analysis of individual genes in these categories will help to elucidate the molecular mechanisms underlying the alteration seen in *miR-106b-25^{-/-}*. One of the genes that could have a relevant function is *Ubc*, a putative target of *miR-106b* and *miR-93* that becomes upregulated in the mutant testes.

1. Introducción

1.1 Determinación del sexo y desarrollo gonadal

La reproducción sexual implica la existencia de dos sexos con características biológicas diferenciadas, macho y hembra, que se determinan genéticamente durante el desarrollo embrionario. En mamíferos, el sexo depende de un sistema de cromosomas sexuales heteromórfico, del tipo XX/XY, en el que los machos son el sexo heterogamético (XY) y las hembras el sexo homogamético (XX) (ver Smith & Sinclair, 2004). La dotación cromosómica de cada individuo queda establecida en el momento de la fecundación, sin embargo, a nivel molecular, la decisión de diferenciarse como macho o como hembra tiene lugar en el momento de la determinación del sexo, punto crítico que precede al desarrollo gonadal de un individuo.

La gónada indiferenciada se caracteriza por ser el único órgano de los mamíferos que tiene el potencial de seguir dos rutas alternativas de desarrollo, hacia testículo o hacia ovario, y esta decisión depende de la presencia o ausencia de factores específicos del sexo. Así, en machos, el factor determinante del sexo ligado al cromosoma Y, *SRY*, activa a *SOX9* que dirige la diferenciación testicular, mientras que en las hembras se activa la ruta de señalización *WNT/β-catenina* que conduce al desarrollo ovárico (Sekido & Lovell-Badge, 2008, 2013; Svingen & Koopman, 2013).

Una vez que las gónadas se han desarrollado, comienzan a producir hormonas específicas de cada sexo, andrógenos por parte del testículo y estrógenos por parte del ovario, que determinan la formación de las características sexuales secundarias. Este proceso se conoce como diferenciación del sexo (Biason-Lauber, 2010). Además, tanto la estructura de los dos órganos, como el tipo de hormonas sexuales que secretan, influyen en la producción y maduración de las células germinales (espermatozoides y oocitos) (Eggers *et al.*, 2014).

1. INTRODUCCIÓN

Tanto la decisión de desarrollarse hacia un sexo u otro (determinación), como la posterior diferenciación y el desarrollo de las gónadas son procesos complejos que requieren una minuciosa red de regulación compuesta por factores de transcripción y moléculas de señalización y alteraciones en estas rutas originan trastornos en el desarrollo del sexo (DSD), problemas de infertilidad o cáncer gonadal.

1.1.1 Gónada bipotencial

En ratones, la cresta genital, de donde posteriormente se desarrollará la gónada, aparece por primera vez en el estadio embrionario 9.5 (E9.5) y se forma a partir de un engrosamiento en la superficie medio-ventral del epitelio mesonefrico, gracias a la proliferación del componente somático de la gónada (células endoteliales, mesoteliales y mesenquimáticas) y al incremento de células germinales primordiales (PGC) (McLaren, 2003). Este primordio gonadal indiferenciado está formado por células precursoras bipotenciales, que tienen la capacidad de seguir uno de los dos destinos posibles (testículo u ovario). Entre estas células se encuentran las células de soporte, que se diferenciarán en células de Sertoli (SC) en el macho o en células de la granulosa en la hembra, las células germinales, capaces de iniciar la espermatogénesis o la oogénesis y las células productoras de hormonas esteroideas, que darán lugar a las células de Leydig en el macho o las células de la teca en la hembra; además encontramos células endoteliales que formarán la vasculatura de la gónada (Merchant-Larios & Taketo, 1991)(dudosa (Merchant-Larios *et al.*, 1993)). La decisión de diferenciarse hacia un tipo celular u otro dependerá de la dotación genética del individuo (Swain & Lovell-Badge, 1999).

Para que la gónada bipotencial se desarrolle correctamente es esencial la expresión de una serie de genes que son comunes en ambos sexos. Estos factores de transcripción se han podido identificar utilizando diferentes cepas de ratones mutantes e incluyen a *Lhx9* (Birk *et al.*, 2000), *Emx2* (Miyamoto *et al.*, 1997), *Wt1* (Kreidberg *et al.*, 1993), *Cbx2* (Katoh-Fukui *et al.*, 1998), *Nr5a1* (Luo *et al.*, 1994; Sadovsky *et al.*, 1995), *Six1/4* (Fujimoto *et al.*, 2013), *Gata4* (Hu *et al.*, 2013) y genes que codifican receptores de insulina *Igf1r/Irr/Ir* (Nef *et al.*, 2003). Mutaciones

1.1. DETERMINACIÓN SEXUAL Y DESARROLLO GONADAL

en cualquiera de estos genes causan defectos en el desarrollo de la cresta genital que no avanza más allá del estado embrionario bipotencial.

Las características más importantes de estos genes son las siguientes:

- ***Nr5a1*** (*nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*), también conocido como ***Sf1*** (*Steroidogenic factor 1*), es un factor de transcripción que se expresa en el epitelio celómico de ambos sexos en E9.5 y posteriormente su expresión queda restringida a las células de Sertoli y a las de Leydig. Los ratones XY mutantes para *Sf1* carecen de gónadas a partir de E12.5 y de glándulas adrenales y tampoco se detecta expresión de SRY (Luo *et al.*, 1994), poniendo de manifiesto su papel esencial en el desarrollo gonadal y en la esteroidogénesis (Val *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 1994).

NR5A1 juega también un papel muy importante junto a SRY en la activación del gen determinante del testículo *Sox9*, mediante la unión específica al potenciador TESCO (*testis-specific enhancer core element*), y una vez que la proteína SRY ha desaparecido, SF1 y SOX9 mantienen la expresión de éste último (Sekido & Lovell-Badge, 2008). Además, ambos regulan los niveles de AMH (homona anti-Mülleriana) (Shen *et al.*, 1994; Arango *et al.*, 1999) y de otros genes asociados con el desarrollo gonadal (Burriss *et al.*, 1995).

- ***Lhx9*** (*LIM homeobox 9*), su expresión comienza en el epitelio celómico en E9.5 y una vez iniciado el desarrollo testicular se localiza en las células de la región intersticial. Los ratones *Lhx9*^{-/-} presentan agenesia gonadal, similar a la observada en los ratones *Sf1*^{-/-} (Luo *et al.*, 1994) y los individuos XY se desarrollan como hembras a nivel fenotípico, debido a la falta de testosterona y de hormona anti-Mülleriana. Además, tienen la expresión de SF1 reducida, indicando que, *Lhx9* no sólo es esencial para la gonadogénesis, sino que podría actuar aguas arriba de *Sf1* en la cascada génica del desarrollo gonadal (Birk *et al.*, 2000).
- ***Emx2*** (*Empty spiracles homeobox 2*), codifica el homeodominio de un factor de transcripción que se expresa en el componente epitelial del sistema urogenital en desarrollo y también tiene un

1. INTRODUCCIÓN

papel crítico en el desarrollo del sistema nervioso. Los ratones deficientes para este gen, carecen de gónadas, de tracto urogenital y de riñones, demostrando que esta proteína tiene una función clave en la formación de la gónada bipotencial y del sistema urogenital (Miyamoto *et al.*, 1997).

- ***Cbx2*** (*Chromobox homolog 2*), también conocido como ***M33*** (*Mouse Polycomb group member M33*), se encarga de regular la transcripción mediante cambios en el estado de la cromatina. Al igual que los genes anteriores, está implicado en el desarrollo de la gónada bipotencial, de hecho, los ratones que tienen mutaciones de pérdida de función (LOF) en este gen presentan reversión sexual XY y defectos en el crecimiento de la cresta genital (Katoh-Fukui *et al.*, 1998). Además, CBX2 podría regular la expresión de *Sry* a través de *Sf1*, porque la proteína CBX2 se une directamente al locus genómico de *Sf1*, y la expresión de SF1 está reducida en los mutantes para *Cbx2* (Katoh-Fukui *et al.*, 2012).
- ***Wt1*** (*Wilms' tumor suppressor gene 1*), se expresa en el mesodermo intermedio a E9, donde se originará en E9.5 la cresta genital (Armstrong *et al.*, 1993; Kreidberg *et al.*, 1993). En adultos, la expresión de *Wt1* se mantiene en las células de la granulosa del ovario y en las células de Sertoli del testículo. Se conocen 24 isoformas de este gen, pero las dos más importantes están definidas por la presencia o ausencia de tres aminoácidos (KTS) situados entre el tercer y cuarto dedo de zinc, denominadas +KTS y -KTS. Los ratones deficientes para la isoforma +KTS presentan reversión sexual de macho a hembra debido a la reducción de la expresión de SRY, sin embargo, la isoforma -KTS no es necesaria para la determinación del sexo, pero sí es importante para la supervivencia del primordio gonadal (Bradford *et al.*, 2009b; Hammes *et al.*, 2001). Además, se ha visto que esta isoforma en cooperación con LHX9 se une al promotor de *Sf1* y activa así su expresión (Wilhelm & Englert, 2002).
- ***Six1/4*** (*sine oculis homeobox homolog 1 and 4*), codifican dos factores de transcripción que tienen un papel redundante durante el desarrollo gonadal (Kawakami *et al.*, 2000) y ambos son requeridos para la formación de la cresta genital y posteriormente, para la

1.1. DETERMINACIÓN SEXUAL Y DESARROLLO GONADAL

diferenciación de la gónada masculina. Las gónadas de los ratones dobles mutantes para *Six1* y *Six4* tienen reducido el número de células precursoras gonadales, un tamaño más pequeño y además, los individuos XY presentan reversión sexual debido al fallo en la activación de *Sry* (Fujimoto *et al.*, 2013).

Del mismo modo, Fujimoto *et al.* (2013) han descubierto dos dianas aguas abajo de *Six1/4* en el desarrollo gonadal, *Fog2* y *Nr5a1*. En el primer caso *Six1/4* activan directamente a *Fog2*, que a su vez regula la expresión de *Sry* en la determinación del sexo masculina, y en el segundo, ambos genes están implicados en la regulación de *Nr5a1*, que se encarga del control de la formación de las células precursoras de las gónadas y de la determinación del tamaño gonadal.

- ***Gata4*** (*GATA-binding protein 4*) es un factor de transcripción necesario para el engrosamiento inicial del epitelio celómico durante la formación de la cresta genital, de hecho, los embriones mutantes condicionales para *Gata4* no tienen signos de iniciación gonadal ya que el epitelio celómico aparece como una monocapa indiferenciada (Hu *et al.*, 2013). Además de su papel en la cresta genital, GATA4 está implicado en la determinación y diferenciación testicular, en primer lugar, GATA4 junto con WT1, activan sinérgicamente la transcripción de *Sry* (Miyamoto *et al.*, 2008) y en segundo lugar, es necesaria la interacción entre *Gata4* y su cofactor ***Fog2*** (*Friend of GATA2*), o también denominado ***Zfpm2*** (*Zinc finger protein multitype 2*) para un correcto desarrollo gonadal (Tevosian *et al.*, 2002), en el caso contrario se produce reversión sexual.
- Además de los factores de transcripción arriba mencionados, las moléculas de señalización implicadas en la actividad del receptor de la tirosina quinasa, son importantes para los estadios iniciales de la determinación del sexo. Por ejemplo, mutaciones en los genes ***Ir*** (*insulin receptor*), ***Irr*** (*insulin-related receptor*) y ***Igflr1*** (*insulin-like growth factor 1 receptor*), reducen la expresión de *Sry* (Nef *et al.*, 2003).

A nivel molecular, el estado bipotencial de la gónada está marcado por dos rutas de señalización que se expresan en las células de soporte de la

1. INTRODUCCIÓN

cresta genital de ambas gónadas XY y XX: **Fgf9** (*Fibroblast growth factor 9*) (Mattei *et al.*, 1995) y **Wnt4** (*Wingless-related MMTV integration site 4*) (Cadigan & Nusse, 1997; Dale, 1998). Será en el momento de la determinación del sexo, que en ratón ocurre en el estadio embrionario 11.5 (E11.5) cuando su expresión se haga sexualmente dimórfica, es decir, expresión alta de *Fgf9* y baja de *Wnt4* en la gónada masculina y expresión baja de *Fgf9* y alta de *Wnt4* en la gónada femenina. La inclinación de la balanza hacia un lado u otro dependerá del sexo genético. En concreto, la presencia del cromosoma Y, y por tanto del gen *Sry*, hará que las células de soporte que forman la gónada se comprometan a diferenciarse en células de Sertoli, dando lugar al desarrollo de un testículo, mientras que en ausencia de cromosoma Y, y del gen *Sry*, las células de soporte se diferenciarán en células foliculares y consecuentemente, se desarrollará un ovario.

1.1.2 Desarrollo testicular

Gracias a los análisis genéticos de individuos con reversión sexual, se pudo identificar el factor determinante del testículo de mamíferos, **SRY** (*sex determining region Y*) (Sinclair *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1990). Su función en la gónada XY es orquestar la diferenciación testicular (Lovell-Badge, 1992; Sinclair *et al.*, 1990), y es capaz de dirigir el desarrollo masculino en ratones transgénicos XX (Koopman *et al.*, 1991), demostrando que **SRY** es el principal interruptor en la determinación del sexo de mamíferos.

Este gen fue el primer miembro de la familia de genes **SOX** (**SRY**-related HMG box) que se descubrió (Schepers *et al.*, 2002; Bowles *et al.*, 2000), y codifica una proteína que contiene un dominio de unión al DNA, conocido como caja HMG (*high mobility group*) (Nasrin *et al.*, 1991), siendo la única región del gen conservada entre especies, de hecho, mutaciones puntuales en la caja HMG producen reversión sexual en humanos (Pontiggia *et al.*, 1994; Harley *et al.*, 1992; Jäger *et al.*, 1990; Berta *et al.*, 1990). Además, el dominio HMG de **SRY** contiene secuencias de señalización que le permiten dirigirse directamente al núcleo de la células donde juega un papel como factor de transcripción (Poulat *et al.*, 1995) regulando gen/es que son esenciales para que las células somáticas indiferenciadas se comprometan y se desarrollen como células de Sertoli.

1.1. DETERMINACIÓN SEXUAL Y DESARROLLO GONADAL

En ratón, *Sry* se expresa transitoriamente en las células de soporte de la cresta genital XY (Wilhelm *et al.*, 2005; Bullejos & Koopman, 2001; Koopman *et al.*, 1990) entre E10.5 y E12.5, y tiene un perfil de expresión muy dinámico, detectándose niveles muy bajos del transcrito en E10.5, que aumentan bruscamente en E11.5 (pico de expresión de *Sry*) para ser reprimidos a partir de E12 (Jeske *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1995).

La regulación del gen *Sry* es bastante desconocida, pero se ha demostrado que ***Wt1*** (*Wilms' tumour suppressor*) es necesario para aumentar los niveles de *Sry* (Hossain & Saunders, 2001; Hammes *et al.*, 2001).

A pesar de que han transcurrido casi 30 años desde que se descubrió *SRY*, hasta ahora la única diana confirmada de este gen es ***SOX9*** (*Sry related HMG box-9*).

En ratones, *Sox9* se expresa débilmente en la gónada bipotencial de ambos sexos hasta E10.5. Posteriormente su expresión disminuye en la gónada femenina mientras que aumenta en la gónada XY (Morais da Silva *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 1996). Este aumento de expresión viene desencadenado por el pico de expresión de *Sry* en E11.5 (momento de la determinación del sexo) (Sekido *et al.*, 2004) que se une, junto con SF1 al potenciador específico del testículo (TES) de *Sox9*. A continuación, SOX9, también se une a este potenciador y junto con SF1 se encargan de mantener los niveles de expresión del propio *Sox9* después de que la transcripción de *Sry* se apague en E12.5 (Sekido & Lovell-Badge, 2008).

Además, sólo las células SRY positivas de la gónada bipotencial serán SOX9 positivas, y una vez que la proteína SOX9 migre al núcleo de estas células pre-Sertoli, éstas se diferenciarán en células de Sertoli que actúan como organizadoras centrales del testículo, orquestando la diferenciación del resto de tipos celulares de la gónada (Hanley *et al.*, 2000; Sekido *et al.*, 2004).

Paralelamente, SOX9 forma dos bucles de retroalimentación positiva, el primero con ***Ptgds*** (*prostaglandin sintetasa*) para reforzar su expresión (Wilhelm *et al.*, 2007) y el segundo con *Fgf9*, necesario para antagonizar la expresión de *Wnt4* y reprimir la cascada de señalización *Wnt*, evitando así el desarrollo ovárico (Kim *et al.*, 2006).

1. INTRODUCCIÓN

Sox9 a su vez, se encarga de dirigir la cascada génica necesaria para la diferenciación de las células de Sertoli funcionando por tanto como un activador transcripcional y regula a **Mis** (*Mullerian-inhibiting substance*) o también conocida como **Amh** (hormona anti-Mülleriana) (De Santa Barbara *et al.*, 1998; Arango *et al.*, 1999), que es necesaria para la degeneración de los conductos de Müller (precursores embrionarios de los órganos sexuales secundarios femeninos) (Chaboissier *et al.*, 2004; Barrionuevo *et al.*, 2006).

Del mismo modo, *Sox9* activa directamente la expresión de otros genes, como **Vnn1** (*Vanin-1*) (Wilson *et al.*, 2005) y **Cbln4** (*cerebellin-4 precursor*) (Bradford *et al.*, 2009a), pero no se conoce muy bien cuál es su función durante el desarrollo del testículo.

Sox8 (*SRY-related HMG box gene 8*) es otro gen que muestra un patrón de expresión específico de células de Sertoli durante el desarrollo embrionario, y aparece por primera vez en E12, justo después de la activación de *Sox9*, sin embargo, los ratones *knockout* homocigotos para *Sox8* no tienen fenotipo gonadal, sugiriendo que tiene redundancia funcional con otro gen (Sock *et al.*, 2001). Se ha podido comprobar que SOX8 activa *in vitro* la expresión de *Amh*, aunque a niveles más bajos comparado con *Sox9* (Schepers *et al.*, 2003).

A nivel morfológico, entre E11.5 y E12.5, la expresión de *Sox9* en las células pre-Sertoli, induce por un lado, la proliferación de las células de soporte y por otro, hace que éstas se diferencien en células de Sertoli, las cuales sufren una transición mesénquima-epitelio, se polarizan y se agregan alrededor de las células germinales para formar los cordones testiculares, estructuras embrionarias que darán lugar a los túbulos seminíferos en el testículo adulto (Sekido *et al.*, 2004), y son fundamentales para la estructura y función testicular. Al mismo tiempo, las células endoteliales migran desde el mesonefros hasta la gónada para formar la vasculatura característica del testículo (vaso celómico que recorre la superficie de la gónada y ramas laterales que se distribuyen entre los cordones), también lo hacen las células mioides peritubulares (PM) y las células fetales de Leydig (para una revisión ver Brennan & Capel, 2004).

Los cordones sexuales se hacen patentes en E12.5, y como se ha comentado anteriormente están formados por una monocapa de células

1.1. DETERMINACIÓN SEXUAL Y DESARROLLO GONADAL

de Sertoli que engloba a las células germinales, y a su vez están rodeados por una capa aplanada de células PM, que contribuyen en la estructura del cordón y promueven el movimiento de los espermatozoides maduros a través de los túbulos seminíferos de los testículos adultos para exportarlos a las vesículas seminales (Tripiciano *et al.*, 1998). En el espacio intersticial se encuentran las células fetales de Leydig y fibroblastos sin caracterizar.

La interacción entre las células de Sertoli y las células PM tiene como resultado la secreción de distintas proteínas de la matriz extracelular (MEC), como la laminina y colágenos, entre otras, necesarias para la formación de la membrana basal que rodea los cordones y mantienen su integridad (Jeanes *et al.*, 2005; Perera *et al.*, 2001; McClive & Sinclair, 2003).

Los testículos embrionarios necesitan producir dos hormonas para asegurar el correcto desarrollo de los conductos genitales masculinos (o de las características sexuales secundarias). Las células de Sertoli, secretan hormona anti-Mülleriana (AMH) que causa la regresión de los conductos de Müller, y las células de Leydig, son las productoras de testosterona, que promueven la diferenciación de los conductos de Wolff y posteriormente, darán lugar al epidídimo, vaso deferente y vesículas seminales. En los testículos postnatales, la espermatogénesis se inicia alrededor del día 10 (P10), cuando las células de Sertoli sufren un proceso conocido como maduración, permitiendo la entrada de las células germinales en el ciclo espermatogénico (Sharpe *et al.*, 2003).

1.1.3 Desarrollo ovárico

Hasta la fecha, no se ha encontrado un factor único determinante del sexo femenino equivalente al *Sry* del testículo. Parece que son varios los genes que actúan de forma coordinada para que la gónada bipotencial XX se determine como un ovario (Warr & Greenfield, 2012). Una de las principales dificultades en el estudio de la diferenciación ovárica es que prácticamente no se detectan cambios morfológicos en la gónada durante la diferenciación de las células de la granulosa, a diferencia de la remodelación tan rápida que tiene lugar en la gónada bipotencial masculina tras la expresión de *Sry* (Cool *et al.*, 2012) y que las células de soporte del

1. INTRODUCCIÓN

ovario parecen proceder de linajes distintos (Rastetter *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014; Mork *et al.*, 2012). Además, al contrario que ocurre en la diferenciación testicular, el desarrollo del ovario presenta diferencias notables entre los distintos taxones (Jiménez, 2009)

Así, la ausencia de *SRY* en la cresta genital XX de mamíferos, permite que a partir de E11.5 aumenten los niveles de expresión de ***RSPO1*** (*R-spondin homolog 1*) y *WNT4* en las células somáticas. Estos dos genes, forman parte de la ruta de señalización *Wnt* (Kim *et al.*, 2006) y estabilizan la β -**catenina** citoplasmática (también conocida como proteína CTNNB1), que se transloca al núcleo y se une a TCF/LEF (*transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor*) para activar la transcripción de otros genes diana necesarios durante el desarrollo ovárico, entre los que se encuentra ***Foxl2*** (*Forkhead box L2*) (Crisponi *et al.*, 2001), ***Fst*** (*Follistatin*) (Yao *et al.*, 2004) y ***Bmp2*** (*bone morphogenetic protein 2*) (Ying & Zhao, 2001; Chakraborty & Roy, 2015). Además, *WNT4* y β -catenina actúan reprimiendo el bucle de retroalimentación positiva *SOX9/FGF9*, permitiendo que progrese la ruta femenina.

En ratones, mutaciones de pérdida de función para *Wnt4* (Vainio *et al.*, 1999), *Rspo1* (Tomizuka *et al.*, 2008) y *Foxl2* (Ottolenghi *et al.*, 2005), resultan en reversión sexual parcial XX, sugiriendo que son varios los genes necesarios para la determinación del ovario, como se comentaba anteriormente. Sin embargo, la mutación de *Foxl2* en cabra (Crisponi *et al.*, 2001; Pailhoux *et al.*, 2001) y de *WNT4* y *RSPO1* en humanos (Parma *et al.*, 2006) resulta en reversión sexual completa, generando un testículo en lugar de un ovario.

Aunque la expresión de los genes específicos femeninos se detecta a partir de E11.5 (Jorgensen & Gao, 2005; Nef *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2004; Bullejos *et al.*, 2002), los primeros cambios morfológicos de la gónada se producen entre E13.5 y E15.5 cuando las células germinales primordiales (PGCs) forman quistes o nidos de células germinales interconectados mediante puentes citoplasmáticos (Byskov, 1986; Pepling & Spradling, 1998) y comienzan a entrar en meiosis siguiendo un patrón antero-posterior (Menke *et al.*, 2003; Bullejos & Koopman, 2004). A partir de este momento hay un alto grado de vascularización en la gónada y los vasos sanguíneos delimitan cadenas de células germinales (Bullejos *et al.*, 2002).

1.1. DETERMINACIÓN SEXUAL Y DESARROLLO GONADAL

Tres días después de nacimiento, se produce una reorganización muy rápida de la morfología del ovario. Los quistes de células germinales se separan y mientras que algunas células germinales individualizadas reclutan células somáticas para formar folículos primordiales (oocito maduro, células de la granulosa y de la teca), la mayoría de estas células se eliminan por apoptosis, limitando el número de folículos primordiales (Liu *et al.*, 2010). Al mismo tiempo, hay una reorganización del ovario en compartimentos morfológicos, la corteza, donde se encuentran los folículos primordiales, y la médula.

Durante la formación de los folículos primarios, las células pregranulosas (escamosas) se transforman en cuboidales y comienzan a proliferar, el oocito aumenta de tamaño, produce la zona pelúcida, y se rodea de células de la teca (esteroidogénicas). Estos procesos están controlados por factores intragonadales, que inician el crecimiento, y factores extragonadales, que sincronizan la función de las células de la granulosa y de la teca en etapas posteriores de la foliculogénesis (para una revisión ver Choi & Rajkovic, 2006).

En el ovario embrionario de ratón, las PGCs se pueden identificar fácilmente por su morfología redondeada, pero no es posible distinguir entre los diferentes tipos de células somáticas. Recientemente, se ha demostrado que las células FOXL2 positivas en el ovario embrionario dan lugar a las células de la granulosa de los folículos medulares que comienzan a crecer inmediatamente después del nacimiento, mientras que las células de la granulosa de los folículos corticales parecen surgir de células que proliferan del epitelio superficial (Mork *et al.*, 2012). Bajo la influencia de factores secretados por los oocitos en desarrollo, estas células pregranulosas se diferencian en células maduras de la granulosa (Orisaka *et al.*, 2009). El origen de las células de teca es menos claro. La primera vez que se observan es después del nacimiento cuando el folículo está formado por dos o más capas de células de la granulosa (Magoffin & Weitsman, 1994) y no se conoce ningún marcador de las células progenitoras de la teca.

El ovario adulto tiene dos funciones principales, la producción de hormonas esteroideas y la generación de oocitos maduros capaces de ser fecundados para generar un embrión (Wilhelm *et al.*, 2007).

1.2 Genes Sox

Los genes *Sox* (*Sry-type HMG box*) codifican un grupo de factores de transcripción muy importante que actúan como reguladores durante el desarrollo pre- y postnatal de vertebrados y de otros taxones de animales, y están muy conservados evolutivamente (Connor *et al.*, 1995; Hosking *et al.*, 1995; Rex *et al.*, 1994; Stevanović *et al.*, 1993; van de Wetering *et al.*, 1993). Estos genes se caracterizan por la presencia de un dominio HMG (*high mobility group*) de unión al DNA, en concreto, este dominio reconoce la secuencia (A/T)ACAA(T/A) localizada en el surco menor del DNA (Harley & Goodfellow, 1994), y tienen una homología superior al 60% con el factor determinante del sexo *SRY* (Denny *et al.*, 1992). La familia de genes *Sox* está compuesta por al menos 20 miembros y se clasifican en 9 grupos según su homología fuera del dominio HMG (Bowles *et al.*, 2000). *Sox8*, *Sox9* y *Sox10* forman el grupo E y están implicados en muchos procesos del desarrollo además de expresarse durante el desarrollo testicular (para una revisión ver Lefebvre *et al.*, 2007).

El estrecho parentesco evolutivo de estos tres genes es patente tanto a nivel génico como de proteína. Los tres genes *SOX E* están formados por tres exones codificantes separados por sus respectivos intrones. Las proteínas SOX8, SOX9 y SOX10 contienen un dominio de dimerización dependiente de DNA N-terminal, la caja HMG y el dominio de transactivación C-terminal. Sin embargo, SOX9 y SOX10 tiene un dominio de transactivación C-terminal fuerte, mientras que el dominio de SOX8 es débil (Schepers *et al.*, 2000; Barrionuevo & Scherer, 2010). Además, la proteína SOX9 tiene un dominio adicional rico en prolina, glutamina y alanina (PQA), que es indispensable para la determinación testicular (Barrionuevo & Scherer, 2010).

El gen estudiado en más detalle es *SOX9*, debido a que mutaciones en heterocigosis causan el síndrome de Displasia Campomélica (CD) en humanos (Wagner *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1994), caracterizado por anomalías en el desarrollo de los huesos, reversión sexual XY, es decir, que los varones desarrollan ovarios en lugar de testículos, y muerte de los pacientes alrededor del nacimiento (Houston *et al.*, 1983). Por otro lado, duplicaciones de la región cromosómica que engloba al *locus* de *SOX9* han originado reversión sexual en una mujer (XX), apoyando así, su

papel fundamental durante el proceso de determinación sexual en machos (Huang *et al.*, 1999).

SOX9 es un gen pleiotrópico que se expresa en multitud de tejidos embrionarios y actúa como un factor crítico en la diferenciación de distintos tipos celulares procedentes de las tres capas germinales. Así, en el mesodermo, es esencial para la formación de las condensaciones mesenquimales implicadas en la condrogénesis, y para la supervivencia de los condrocitos (Wright *et al.*, 1995; Akiyama *et al.*, 2002), también es necesario para el correcto desarrollo de las válvulas y el tabique intraventricular del corazón (Akiyama *et al.*, 2004), y durante el desarrollo gonadal, *SOX9* es la diana directa del gen determinante del testículo (*SRY*), siendo necesario y suficiente para la diferenciación testicular (papel que se comentará en más detalle en el siguiente apartado: subsección 1.2.1) (Barrionuevo *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2001). En el ectodermo, *Sox9* está implicado en la gliogénesis (Stolt *et al.*, 2003) y es necesario para la especificación de las células progenitoras de la cresta neural (Cheung & Briscoe, 2003). También juega un papel importante en la invaginación de la placoda ótica (Barrionuevo *et al.*, 2008) y en la especificación de la vaina externa de la raíz del folículo piloso (Vidal *et al.*, 2005). Por último, en el endodermo, *Sox9* se encarga de la diferenciación de las células de Paneth del epitelio intestinal (Bastide *et al.*, 2007), del desarrollo de la tráquea (Turcatel *et al.*, 2013) y es fundamental para el mantenimiento de las células madre del páncreas (Bastide *et al.*, 2007).

En el adulto, *SOX9* se expresa en diversos tipos celulares, y funciona como factor de transcripción implicado en el mantenimiento y diferenciación de células madres encargadas de la homeostasis y regeneración de los tejidos u órganos adultos. Así, *Sox9* se expresa en las células progenitoras que dan lugar a las células adultas intestinales, los hepatocitos y las células acinares pancreáticas. Además, estos progenitores desempeñan un papel fundamental en la regeneración del hígado (Furuyama *et al.*, 2011). Por otro lado, *Sox9* y *Slug* determinan el *estatus* de las células madre de la glándula mamaria (Guo *et al.*, 2012). En la hipófisis también existe una población de células madre que expresan *Sox9* y *Sox2* y que dan lugar a células endocrinas (Rizzoti *et al.*, 2013). *Sox9* también es necesario para la especificación de las células madre del folículo piloso (Nowak *et al.*, 2008) y para el mantenimiento de una población de células madre multipotentes

1. INTRODUCCIÓN

de los bulbos olfatorios (Scott *et al.*, 2010). Por último, en el periostio de los huesos adultos, existe un grupo de células progenitoras que expresan *Sox9* y están implicadas en la reposición de condrocitos, osteoblastos y osteocitos maduros tras una fractura (He *et al.*, 2017).

1.2.1 *Sox8*, *Sox9* y *Sox10* en el desarrollo testicular

Las funciones de *Sox8*, *Sox9* y *Sox10* durante la gonadogénesis en ratón, se pueden dividir en dos etapas, antes y después del momento de la determinación sexual.

Inicialmente, *Sox9* se expresa en la gónada bipotencial de ambos sexos en E10.5, pero su expresión disminuye en el ovario y es incrementada fuertemente en la gónada XY, concomitante con el pico de expresión de *Sry* en E11.5 (Kent *et al.*, 1996; Morais da Silva *et al.*, 1996). *Sox9* también puede sustituir a *Sry* como factor determinante del testículo, ya que la expresión ectópica del transgen *Sox9* (Vidal *et al.*, 2001) y mutaciones que aumentan la expresión de este gen (Qin *et al.*, 2004) provocan el desarrollo de testículos en ratones XX, demostrando que *Sox9* es suficiente para inducir la diferenciación testicular. Posteriormente, la expresión de *Sox9* se mantiene en las células de Sertoli durante todo el desarrollo testicular (Sekido *et al.*, 2004). La expresión de *Sox8* aparece por primera vez en la cresta genital masculina en E12.0, poco después del aumento de los niveles de *Sox9* (Schepers *et al.*, 2003), y se sabe que *Sox9* es necesario para el inicio de la expresión de *Sox8* en la determinación del sexo, pero no lo es para el mantenimiento de su expresión (Qin & Bishop, 2005; O'Bryan *et al.*, 2008). El gen *Sox10* se expresa a niveles bajos en la gónada temprana de ambos sexos en E10.5, y se vuelve específico de células de Sertoli después de E11.5 (Polanco *et al.*, 2010). Cuando se elimina *Sox9* y *Sox8* en las células de Sertoli, la expresión de *Sox10* se reduce, indicando que ambos genes participan en el mantenimiento de la expresión de *Sox10* en los testículos en desarrollo (Georg *et al.*, 2012). Además, tanto experimentos *in vitro* como *in vivo* han demostrado que *Sox10* sinergiza con SF1 para unirse al potenciador TESCO (*testis-specific enhancer of Sox9 core element*) de *Sox9*, y la sobre-expresión de *Sox10* en gónadas de ratón XX sugiere que este gen podría regular la expresión de *Sox9* (Polanco *et al.*, 2010).

Después del momento de la determinación del sexo, *Sox9* es dispensable para el desarrollo de los cordones testiculares, para la proliferación de los conductos de Wolff y para la regresión de los conductos de Müller, puesto que tras la ablación de *Sox9* en E14.5, los ratones muestran un desarrollo embrionario y postnatal normal. Sin embargo, aunque estos ratones son fértiles al principio, alrededor de los 5 meses se vuelven estériles debido a una disfunción en el ciclo espermatogénico que comienza con la reducción del número de espermátidas (Barrionuevo *et al.*, 2009). Sugiriendo que aunque *Sox9* no sea necesario para la diferenciación de los cordones después de E14.5, sí lo es para el mantenimiento de la función testicular y para la fertilidad. Cuando la delección es del gen *Sox8*, los ratones no muestran ninguna alteración en la determinación sexual ni en el desarrollo del testículo, probablemente por la compensación funcional de *Sox9* y *Sox10* (Chaboissier *et al.*, 2004), pero se vuelven progresivamente estériles después de la primera oleada de espermatogénesis, donde las células de Sertoli pierden funcionalidad con la edad, indicando que *Sox8* es imprescindible para la maduración inicial de los espermatozoides y para el mantenimiento de la fertilidad masculina (O'Bryan *et al.*, 2008). Estudios más recientes, han demostrado que las gónadas adultas sin *Sox8* tienen reducidos los niveles de moléculas de adhesión celular que forman las uniones estrechas entre las células de Sertoli como *Claudin-3*, permeabilidad de la barrera hematotesticular y defectos en el mantenimiento del microambiente del epitelio seminífero (Singh *et al.*, 2013). Por último, los ratones *Sox10*^{-/-} no presentan ninguna alteración en el desarrollo del testículo, indicando que este gen no es esencial para la diferenciación del sexo (Britsch *et al.*, 2001; Peirano & Wegner, 2000). Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que la proteína SOX10 se puede regular directamente el gen *Sox9* y que SOX10 junto con SF1 activan el promotor del gen *Amh*. Además, la sobre-expresión de *Sox10* en ratones XX causa reversión sexual parcial o completa de hembra a macho (Polanco *et al.*, 2010). Por tanto, *Sox10* tendría una función redundante en la determinación y posterior diferenciación del testículo y su papel estaría enmascarado por *Sox8* y *Sox9*.

Los ratones *knockout* para *Sox9* y los ratones mutantes para *Sox8* y *Sox9* antes de E11.5 muestran reversión sexual XY, sugiriendo que *Sox8* refuerza la función de *Sox9* durante la diferenciación testicular

1. INTRODUCCIÓN

(Barrionuevo *et al.*, 2006; Chaboissier *et al.*, 2004). Del mismo modo, cuando la expresión de estos dos factores se elimina después de la determinación del sexo, se interrumpe la formación de los cordones testiculares y después del día postnatal 6 (P6), los ratones sufren infertilidad primaria y ausencia de estructuras tubulares (Barrionuevo *et al.*, 2009). Además, los cordones se desagregan progresivamente, hay delaminación de las células de Sertoli y las moléculas de adhesión celular y de la matriz extracelular se pierden (Georg *et al.*, 2012).

1.3 Antagonismo de las rutas masculina y femenina

Durante la determinación del sexo, las señales masculinas y femeninas se oponen entre sí para que la gónada indiferenciada se desarrolle como ovario o como testículo. De hecho, la pérdida de SRY o SOX9, permite la activación de la ruta de señalización WNT y conduce a la formación de ovarios XY (Barrionuevo *et al.*, 2006; Chaboissier *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2001; Bishop *et al.*, 2000; Berta *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1994) mientras que la pérdida de moléculas de señalización de la ruta WNT, como WNT4 o RSPO1, resulta en la expresión ectópica de factores masculinos como *Sox9* y *Fgf9* (Chassot *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006; Parma *et al.*, 2006; Vainio *et al.*, 1999).

De forma similar, los experimentos de ganancia de función confirman el antagonismo macho-hembra, así, la sobre-expresión de genes promotores del testículo como *Sox9* o ***Dmrt1*** (*DSX- and MAB3-related transcription factors*) en la gónada bipotencial XX da lugar a reversión sexual XX (Zhao *et al.*, 2015; Vidal *et al.*, 2001; Bishop *et al.*, 2000), mientras que la activación ectópica de la forma estable de β -*catenina* en una gónada indiferenciada XY origina reversión sexual XY (Maatouk *et al.*, 2008a).

Este antagonismo también funciona en los testículos embrionarios ya diferenciados. La ablación condicional de *Wt1* en las células de Sertoli utilizando el alelo *Amh-Cre* da lugar a la pérdida de la expresión de SOX9, SOX8 y AMH en E14.5, se detecta β -*catenina* y los machos adultos tienen útero, además de los derivados del conducto de Wolff (Gao *et al.*, 2006).

1.3. ANTAGONISMO MASCULINO/FEMENINO

Del mismo modo, la inactivación condicional de *Sox9* en las células de Sertoli con un fondo genético *Sox8*^{-/-} en E13.5 (alelo *Amh-Cre*) tiene como consecuencia la pérdida de *Dmrt1* y la sobre-expresión de genes específicos del ovario como *Wnt4*, *Rspo1* y *Foxl2* (Georg *et al.*, 2012; Barrionuevo *et al.*, 2009). De forma similar, la ablación específica de *Dmrt1* en células de Sertoli en E13.5 (*Sf1-Cre* y *Dhh-Cre*) resulta en la expresión ectópica de *Foxl2* en el día postnatal 14 (P14) y en el cese de la expresión de *Sox9* en P28, incluyendo reprogramación genética de macho a hembra, como revela el perfil de mRNA (Matson *et al.*, 2011a).

De nuevo, experimentos de ganancia de función, confirman la existencia del antagonismo sexual después del periodo de determinación del sexo, por ejemplo, la estabilización condicional de *β-catenina* en las células embrionarias de Sertoli diferenciadas (E13.5, *Amh-Cre*) resulta en la desorganización de los cordones testiculares y en la pérdida de genes específicos de este tipo celular (Chang *et al.*, 2008). Además, las células de Sertoli mutantes se transforman en células tipo granulosa y expresan *Foxl2* (Li *et al.*, 2017b).

Durante muchos años, los investigadores han creído que el fenómeno de reversión sexual ocurriría sólo durante la etapa embrionaria, pero una vez que los ovarios y testículos están completamente desarrollados y son funcionales, serían órganos inmutables. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la naturaleza bipotencial de la gónada persiste en los órganos adultos, siendo necesaria la expresión de genes clave tanto en testículos como en ovarios diferenciados para mantener el sexo y evitar la reprogramación genética (Veitia, 2010).

Así, tras la ablación de *Foxl2* en células de la granulosa adultas y fértiles, utilizando el alelo *R26-CreERT2* inducible por tamoxifeno, éstas células se transdiferencian en células tipo Sertoli con expresión ectópica de *Sox9* y las células de la teca se transdiferencian en células tipo Leydig y producen testosterona, revelando que las células somáticas femeninas diferenciadas a término, requieren la represión permanente de factores promotores masculinos para mantener su correcta identidad y función (Uhlenhaut *et al.*, 2009). Además, la expresión transgénica de *Dmrt1* en el ovario adulto silencia la expresión de *Foxl2* y las células de la granulosa se transdiferencian en células tipo Sertoli, que expresan *Sox9* (Lindeman *et al.*, 2015).

1. INTRODUCCIÓN

En cuanto al testículo adulto, la eliminación del factor de transcripción DMRT1 en células de Sertoli completamente diferenciadas y funcionales, utilizando un promotor ubicuo e inducible (UBC-*CreERT2*), tiene como consecuencia que en la gónada haya células con la morfología típica de Sertoli, que expresan tanto SOX9 como FOXL2, y células con características típicas de células de la granulosa, que muestran ausencia de SOX9 y presencia de FOXL2 (Matson *et al.*, 2011a). Sin embargo, la transdiferenciación celular de Sertoli a Granulosa y la posible reprogramación genética no se han investigado en profundidad debido a que, por un lado, se ha utilizado la recombinasa Cre bajo el control de un promotor ubicuo para eliminar la expresión de *Dmrt1* en la gónada (eliminando el gen tanto de células de Sertoli como de células germinales) y por otro a la falta de un perfil de expresión de mRNA en los testículos mutantes adultos.

Estos estudios, revelan la alta plasticidad que tienen las células somáticas de la gónada incluso en el estadio adulto, donde es imprescindible que se reprima de forma activa el programa genético opuesto durante toda la vida.

El papel de SOX9 en el testículo adulto es desconocido, pero se sabe que se expresa en las células de Sertoli de forma dependiente del estadio espermatogénico en diferentes especies (Massoud *et al.*, 2014; Dadhich *et al.*, 2011; Fröjdman *et al.*, 2000). Varias observaciones sugieren que *Sox9* junto a *Sox8* podrían desempeñar una función clave en la gónada adulta: 1) durante el desarrollo testicular, la inactivación de ambos genes *Sox* en las células de Sertoli provoca infertilidad primaria, pérdida de la expresión de genes promotores del testículo como *Dmrt1* y expresión ectópica de *Foxl2* (Georg *et al.*, 2012; Barrionuevo *et al.*, 2009), 2) en el proceso de transdiferenciación de las células de Sertoli en células de la granulosa tras la ablación de *Dmrt1* en el desarrollo testicular, la expresión de *Sox9* se mantiene inicialmente en las células de Sertoli y la expresión ectópica de *Foxl2* no comienza hasta que SOX9 se apaga (Matson *et al.*, 2011a) y 3) cuando *Foxl2* se elimina de las células de la granulosa adultas, se produce la sobre-expresión de *Sox9* y *Sox8* (Uhlenhaut *et al.*, 2009).

Como se verá más adelante, éste es por tanto el primer objetivo propuesto de la presente tesis doctoral, y para ello, hemos utilizado dos líneas de ratones *Cre* que nos permiten inducir la ablación de *Sox9* específicamente en células de Sertoli del testículo de ratón adulto en un

fondo genético *Sox8*^{-/-} (*Wt1-CreERT2* y *Sox9-CreERT2*), comenzando en el día postnatal 60 (P60).

1.4 Células de Sertoli y barrera hemato-testicular

Los testículos adultos de mamíferos están formados por túbulos seminíferos rodeados de tejido intersticial, donde se encuentran las células de Leydig, los vasos sanguíneos, leucocitos y fibroblastos. Las células de Sertoli (SCs), son células epiteliales de soporte que componen los túbulos seminíferos, y su función principal es mantener la espermatogénesis, para ello, proporcionan soporte estructural, hacen de células nodrizas y regulan la función de las células germinales (GC) a través de moléculas de señalización (Griswold, 1998). También producen el líquido seminífero y forman la barrera hemato-testicular BTB (*blood-testis-barrier*), un complejo de unión especializado entre células de Sertoli formado por moléculas de adhesión celular que define un compartimento basal y un compartimento adluminal en el epitelio seminífero y sirve como barrera inmunológica, creando un microambiente único para el desarrollo de las GC. Además, las SC controlan la autorenovación y la supervivencia de las espermatogonias, así como la fagocitosis de espermatoцитos apoptóticos y los restos celulares derivados de la espermiogénesis (Kaur *et al.*, 2014). Además de las células de Sertoli, las células germinales maduras están rodeadas por una o varias capas de células mioideas peritubulares (PM), según sean roedores o mamíferos grandes, respectivamente (Dym & Fawcett, 1970; Dym, 1973).

La espermatogénesis, es un proceso muy complejo y altamente organizado en el que las células germinales experimentan tres fases de desarrollo: 1) la mitosis, que permite la proliferación de las espermatogonias de tipo A y B, 2) la meiosis, que favorece la recombinación del material genético (espermatoцитos primarios y secundarios) y genera células haploides (espermátidas) y 3) la espermiogénesis, proceso por el cual las espermátidas se transforman en espermatozoides. Durante todo este ciclo, las células migran desde el compartimento basal de los túbulos seminíferos al adluminal, atravesando la BTB, hasta que finalmente tiene lugar la espermiación, y los espermatozoides maduros son liberados de las SC a la luz de los túbulos y transportados a través de la *rete testis* y conductos eferentes hacia el epidídimo (Hess & Renato de Franca, 2008; Oatley & Brinster, 2012).

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las células germinales, meióticas y postmeióticas, necesitan protección inmunitaria, ya que aparecen por primera vez en la pubertad, después de que se haya establecido la tolerancia sistémica. Estas células expresan antígenos de superficie e intracelulares nuevos, que podrían ser reconocidos como extraños y desencadenar una respuesta inmunológica. De modo que, gracias a la BTB que forman las células de Sertoli y a los factores inmunorreguladores que producen, las células germinales auto-antigénicas quedan protegidas del sistema inmune del huésped, manteniendo así la espermatogénesis que es fundamental para la supervivencia de las especies (Mital *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2013; Tung & Fritz, 1978; O’Rand & Romrell, 1977).

1.5 Micro-RNAs

Los microRNAs (miRNAs) son una familia de RNAs pequeños (20-25 nucleótidos) y no codificantes que controlan la expresión de genes en animales, plantas y eucariotas unicelulares a nivel post-transcripcional, ya sea inhibiendo la traducción de las proteínas y/o por degradación del RNA mensajero (mRNA) (Siomi & Siomi, 2010). Llevan a cabo su función reguladora uniéndose por complementariedad de bases, parcial o total, a la región 3’ no transcrita (3’UTR, *3’ untranslated regions*) de los mRNAs diana (Shyu *et al.*, 2008), aunque también se pueden unir a otras partes de los genes como a los exones codificantes de proteínas (Rigoutsos, 2009). Los miRNA están involucrados en multitud de procesos fisiológicos, como diferenciación celular, regulación del ciclo celular y apoptosis, y del desarrollo (Bushati & Cohen, 2007), por lo que las alteraciones en su regulación están estrechamente relacionadas con enfermedades humanas como el cáncer (Garzon *et al.*, 2009; Chang & Mendell, 2007). Además, una alta proporción de estos miRNAs tiene patrones de expresión específicos de tejido o dependientes del estadio de desarrollo, que resultan alterados durante la enfermedad.

Las aproximaciones computacionales indican que un único miRNA tendría el potencial de regular a más de cien mRNA en un mismo tipo celular (Selbach *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2008) y, además, cada mRNA podría tener dianas para múltiples miRNAs. En el genoma humano, se han

identificado más de 1 000 genes para miRNAs y se encuentran clasificados en *miRbase* (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). Se predice que más del 60 % de los genes codificantes de proteínas en humanos contienen sitios de unión para los miRNAs dentro de las regiones 3'UTR (Friedman *et al.*, 2009). Por tanto, se puede considerar que los miRNAs constituyen una de las clases de moléculas reguladoras de genes más abundantes en animales.

1.5.1 Biogénesis de los miRNAs

Aproximadamente el 80 % de los genes de miRNAs se localizan en regiones intrónicas del genoma y el 20 % restante se encuentran repartidos entre los exones y las regiones intergénicas. Casi la mitad de los miRNAs se agrupan en familias, que comparten la región semilla o “*seed*” (secuencia de nucleótidos por la que los miRNAs se unen al extremo 3'UTR del mRNA diana) o en *clusters*, que son grupos de miRNAs situados en la misma región genómica y se transcriben como policistrones primarios (Kim *et al.*, 2009a).

El mecanismo de biogénesis está evolutivamente muy conservado. Así, en la mayoría de los mamíferos, los genes de los miRNAs son transcritos en el núcleo de la célula por la RNA polimerasa II, generando el miRNA primario o **pri-miRNA** que contiene una o más estructuras horquilladas, cada una compuesta por un tallo (*stem*) y un bucle (*loop*) terminal, es bicatenario y tiene varias kilobases (kb) de longitud. Además, pueden contener modificaciones como la caperuza en el extremo 5' y la cola poli-A en 3', y suelen generar más de un miRNA funcional (Kim *et al.*, 2009b; Carthew & Sontheimer, 2009). A continuación, se producen dos reacciones secuenciales, la primera en el núcleo y la segunda en el citoplasma, donde se genera el miRNA maduro. En el núcleo, el Microprocesador, que es un complejo multiproteico, se encarga del cortar el pri-miRNA y crea un precursor de 70 nucleótidos con forma de horquilla, el **pre-miRNA**. Los dos componentes principales del Microprocesador son **DROSHA**, que pertenece a la familia de la RNasa III, y DGCR8/Pasha, una proteína con dominios de unión al RNA de doble cadena (dsRBD, *double-stranded RNA-binding*) (Han *et al.*, 2004; Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). A continuación, el pre-miRNA es exportado al citoplasma por Exportin-5 (EXP-5) asociado al cofactor Ran que está acoplado a

1. INTRODUCCIÓN

GTP (Okada *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009b; Bohnsack *et al.*, 2004). En el citoplasma, el GTP es reemplazado por GDP y la Exportin-5 libera al pre-miRNA, donde es cortado por otra RNasa tipo III, **DICER**, acompañada con proteínas dsRBD (TRBP/PACT), elimina la horquilla característica y genera un dúplex **miRNA/miRNA*** de unos 22 pares de bases (Lee *et al.*, 2006; Chendrimada *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2005). Posteriormente, la proteína Argonauta (AGO) se asocia al dúplex e incorpora la hebra correspondiente al miRNA maduro al complejo silenciador inducido por RNA, **RISC** o **miRISC** (*RNA-inducing silencing complex*) (Mourelatos *et al.*, 2002; Hutvagner & Zamore, 2002; Hammond *et al.*, 2001). El miRNA ahora actúa como guía de RISC para mediar la represión de sus mRNA diana (Flynt & Lai, 2008). Para generar el miRNA maduro, que es de cadena sencilla, se debe disolver el dúplex y eliminar la hebra sobrante. La elección de una hebra u otra depende de cuestiones termodinámicas relacionadas con la inestabilidad en cuanto a la composición de pares de bases del extremo 5' (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). La hebra que se incorpora al complejo RISC recibe el nombre de hebra guía (miRNA), mientras que la hebra no seleccionada, se denomina hebra pasajera (miRNA*). No siempre se degrada la hebra pasajera, a veces puede dar lugar a un miRNA maduro funcional (Preall & Sontheimer, 2005; Diederichs & Haber, 2007; Obernosterer *et al.*, 2006; Carthew & Sontheimer, 2009; Kim *et al.*, 2009b) (Ver Figura 1.1).

Se ha descrito un grupo minoritario de genes de miRNAs localizados en intrones muy cortos, denominados mirtrones, y para su procesamiento no requieren la intervención de DROSHA ni de DGCR8 (Ruby *et al.*, 2007; Chan & Slack, 2007; Berezikov *et al.*, 2007).

La biogénesis de los miRNAs está rigurosamente controlada y puede ocurrir a tres niveles, durante la transcripción de los genes, por medio de la edición de moléculas de RNA de doble cadena y durante los procesamientos mediados por DROSHA/DGCR8 y DICER (para una revisión ver Davis & Hata (2009); Carthew & Sontheimer (2009)).

1.5.2 miRNAs y desarrollo gonadal

Actualmente, en el genoma de ratón se encuentran más de 3000 genes de miRNAs, y muchos de ellos se expresan en las células somáticas

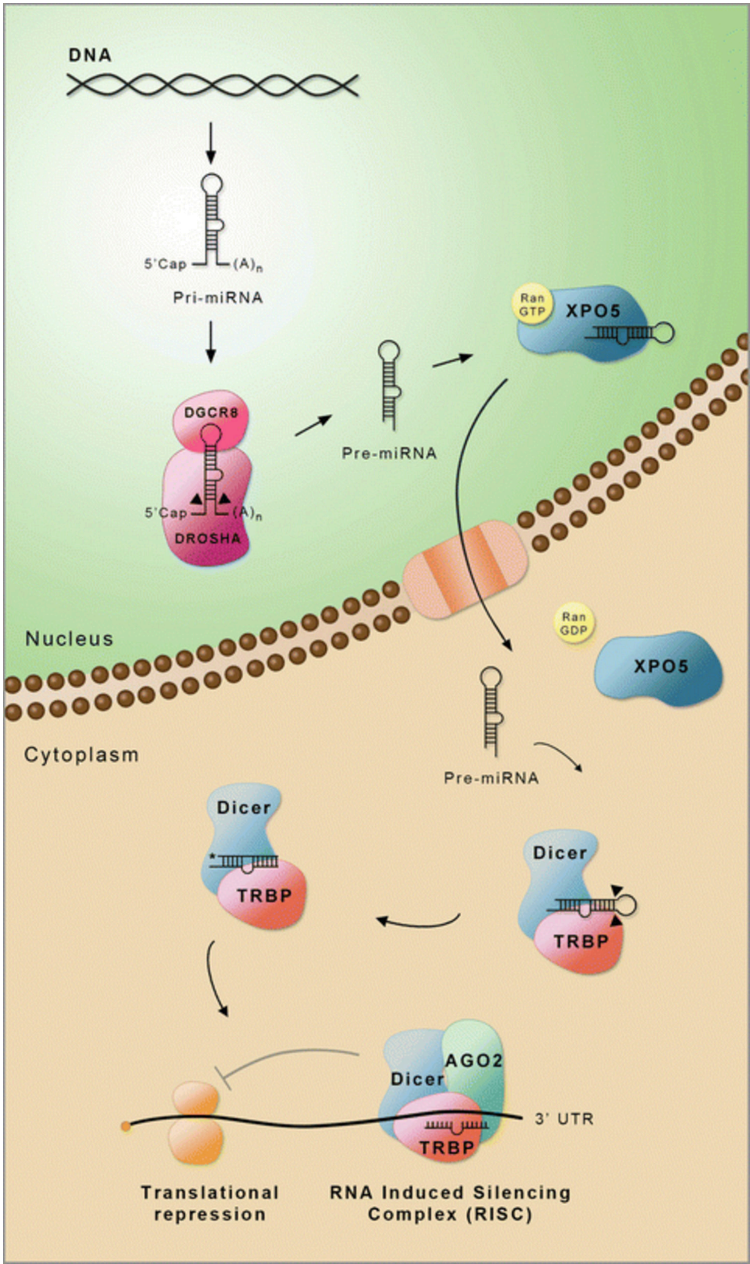


Figura 1.1: Biogénesis de los miRNAs: Imagen tomada de (Melo & Melo, 2014)

1. INTRODUCCIÓN

y germinales de las gónadas, sugiriendo que podrían tener un papel importante en el desarrollo y la función fisiológica de ovarios y testículos. Como se ha comentado anteriormente, tanto la diferenciación sexual como el posterior desarrollo gonadal son procesos regulados minuciosamente por genes específicos del sexo y por las hormonas secretadas por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Es en este aspecto donde los miRNAs podrían ejercer su efecto, ya sea directamente, a través del silenciamiento de la expresión de proteínas clave o indirectamente, actuando a nivel hipotálamo-hipófisis (Grossman & Shalgi, 2016).

Varios estudios han demostrado que el perfil de expresión de miRNAs es diferente en testículos y ovarios, tanto en el estadio adulto (Mishima *et al.*, 2008) como en las gónadas prenatales (Rakoczy *et al.*, 2013), implicándolos en las funciones reproductivas y en el proceso de desarrollo. Además, su perfil de expresión también es sexualmente dimórfico justo en el momento de la determinación del sexo (E11.5) (Real *et al.*, 2013) y dos días después (E13.5) (Takada *et al.*, 2009), evidenciando el papel clave de los miRNAs en la diferenciación sexual. De hecho, Wainwright *et al.* (2013) revelaron que *Sox9* regula la expresión de *miR-202-5p* y *miR-202-3p*, dos miRNAs que se expresan preferentemente en las células de Sertoli, sugiriendo su participación en el desarrollo temprano del testículo. Por otro lado, *miR-124* muestra un patrón de expresión similar en ambas gónadas en E11.5, pero aumenta drásticamente en el ovario después del momento crítico de la determinación (E13.5), además, cuando se elimina la expresión de este miRNA en la gónada XX de E13.5, se activa la expresión de *Sox9*, indicando que *miR-124* es suficiente para reprimir la transcripción y traducción del factor protesticular SOX9 en el ovario (Real *et al.*, 2013).

miRNAs y células de Sertoli

Atendiendo al testículo, los miRNAs tienen un papel central en la regulación de la espermatogénesis y en la fertilidad masculina (Kotaja, 2014) y su función en las células de Sertoli, donde se expresan abundantemente, está empezando a emerger. Así, la expresión de muchos miRNAs en las células de Sertoli adultas es dependiente de testosterona, mientras que la expresión de otros, está regulada diferencialmente por la primera oleada

de espermatozoides, proponiendo que la regulación de la espermatogénesis mediada por andrógenos, es en parte, dependiente de la expresión de miRNAs (Panneerdoss *et al.*, 2012). Para entender mejor la participación de estos RNAs pequeños en la función de las células de Sertoli y su contribución a la espermatogénesis, se generó un modelo de ratón transgénico en el que DICER, la enzima que genera el miRNA maduro durante la biogénesis, está suprimida condicionalmente (cKO, *conditional knockout*) en las células de Sertoli (alelo *Amh-Cre*) (Kim *et al.*, 2010; Papaioannou *et al.*, 2009). Estos ratones mostraron un desarrollo testicular normal, sin embargo, tras el nacimiento, el testículo comenzó a mostrar un fenotipo aberrante, con apoptosis masiva de células de Sertoli y espermatogonias que resultó en una disminución drástica del tamaño de la gónada y en esterilidad primaria, además, el análisis del transcriptoma de las gónadas mutantes indicó que la expresión génica estaba ya alterada desde P0. Todo esto indica que los miRNAs expresados por las células de Sertoli son necesarios tanto para la supervivencia y función de las propias células como para la espermatogénesis (Papaioannou *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010; Papaioannou *et al.*, 2009).

miRNAs y células de germinales

Durante la espermatogénesis del ratón, los miRNAs se expresan diferencialmente en los distintos estadios del proceso (Yan *et al.*, 2007; Sree *et al.*, 2014; Buchold *et al.*, 2010; Ro *et al.*, 2007), y además, su distribución cromosómica no es aleatoria, por ejemplo, los testículos en P7 están enriquecidos en miRNAs procedentes del cromosoma 7 y los de P14 tienen más miRNAs provenientes de los cromosomas 2 y X (Buchold *et al.*, 2010), además Sree *et al.* (2014) encontraron cambios en el perfil de expresión de los miRNAs entre los testículos de ratones de P8, P16 y P24, localizados sobre todo en el cromosoma X. Al igual que en las células de Sertoli, el papel general de los miARNs en las células espermatogoniales fue evaluado utilizando ratones cKO en los que *Dicer* fue eliminado de estas células utilizando el sistema de recombinación *Cre-LoxP*. En este caso, se utilizaron varios promotores para dirigir la actividad de la recombinasa Cre, que permitieron suprimir la expresión de *Dicer* en las diferentes células generadas durante la espermatogénesis y en los distintos estadios del proceso,

1. INTRODUCCIÓN

y dieron lugar a una amplia variedad de fenotipos. Así, cuando se utiliza el promotor de la fosfatasa alcalina inespecífica tisular (*Tnap-Cre*, *Tissue nonspecific alkaline phosphatase*), *Dicer* se elimina de las células germinales primordiales (PGCs) a partir de E10 (Lomelí *et al.*, 2000) y los testículos de estos ratones tienen atenuada la proliferación de las PGCs (Hayashi *et al.*, 2008) y las espermátidas diferenciadas muestran una morfología anormal (Maatouk *et al.*, 2008b). En el caso del alelo *Vasa/Ddx4-Cre*, la delección de *Dicer* de las células germinales comienza en E12.5 y alcanza el 90 % de efectividad en E18 (Gallardo *et al.*, 2007), en esta ocasión los ratones mutantes condicionales para *Dicer* tienen reducido el tamaño de la gónada, la estructura de los túbulos seminíferos alterada, hay un gran aumento de la apoptosis y la espermiogénesis está dañada, por lo que estos ratones presentan diferentes grados de sub-fertilidad (Zimmermann *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2011).

Para evaluar si el momento de la delección de *Dicer* tiene impacto en la fertilidad de los ratones, Liu *et al.* (2012) utilizaron dos promotores para dirigir la expresión de Cre, *Stra8* (*Stimulated by retinoic acid 8*) y *Pgk2* (*Phosphoglycerate kinase 2*). En el primer caso, los ratones muestran un fenotipo similar al descrito anteriormente (*Vasa/Ddx4-Cre*) (Liu *et al.*, 2012), aunque algunos fueron completamente estériles (Wu *et al.*, 2012; Greenlee *et al.*, 2012). En el segundo caso, *Pgk2-Cre*, *Dicer* es mutada en espermátidas y espermátidas, pero los ratones no muestran ningún fenotipo prominente (Liu *et al.*, 2012). Existen varios estudios más en los que *Dicer* se elimina de forma selectiva en los distintos tipos celulares y en diferentes momentos tanto del desarrollo embrionario como después del nacimiento (Chang *et al.*, 2012; Korhonen *et al.*, 2011), pero en conjunto parece que DICER es necesaria para la diferenciación de las células germinales masculinas, y la diversa severidad de fenotipos observados en los distintos modelos de ratones KO se atribuye tanto al momento en el que se elimina *Dicer* como a la ineficiencia en su delección.

Como se ha descrito anteriormente, DICER es necesaria para la biogénesis de los miRNAs, pero también lo es para la biosíntesis de los RNAs pequeños de interferencia, siRNA (*small interfering RNA*) (para una revisión ver Carthew & Sontheimer, 2009). Para discernir entre la contribución de miRNAs y siRNAs al fenotipo de los ratones cKO de *Dicer*, se han utilizado varias líneas de ratones en las que

se han eliminado diferentes proteínas exclusivas de la biogénesis de miRNAs condicionalmente en células espermatogoniales (Kotaja, 2014). Así, cuando se deletiona *Drosha*, se altera el procesamiento de los pri-miRNAs en miRNAs maduros pero los siRNAs permanecen intactos (Abdelfattah *et al.*, 2014).

La ablación específica de *Drosha* en las células germinales utilizando el promotor de *Stra8* para dirigir la expresión de la recombinasa Cre, produce esterilidad en los individuos debido a la destrucción de la espermatogénesis (Wu *et al.*, 2012). Curiosamente, estos ratones mostraron fenotipos más severos que los ratones cKO para *Dicer* con el mismo promotor. La secuenciación de los miRNAs de espermatoцитos en paquitene y espermátidas redondeadas, ha permitido identificar varios miRNAs sobre-expresados en las células *Drosha* cKO, pero infra-expresados o ausentes en las células *Dicer* cKO, y viceversa (Wu *et al.*, 2012).

DROSHA necesita formar un complejo con DGCR8 para procesar con éxito los pri-miRNAs (Nguyen *et al.*, 2015). Zimmermann *et al.* (2014) compararon el fenotipo de los ratones *Dicer* cKO con el de los ratones *Dgcr8* cKO (alelo *Vasa/Ddx4-Cre*) y ambos presentaron defectos similares, aunque el fenotipo de los ratones *Dgcr8* cKO fue más leve. Estos hallazgos refuerzan la importancia de los miARNs en el desarrollo de los testículos y enfatizan el papel de los siRNAs. Otros estudios, han optado por analizar el fenotipo de los ratones mutantes condicionales para las proteínas AGO, necesarias para incorporar el miRNA maduro al complejo RISC (Ma *et al.*, 2014; Modzelewski *et al.*, 2012).

miRNAs específicos en la función testicular

Varios miARNs se han relacionado con la regulación de la auto-renovación de las células madre espermatogoniales (SSCs, *spermatogonial stem cells*), entre ellos se encuentran *miR-21*, *miR-20* y *miR-106a*, que se expresan preferentemente en este tipo celular (Niu *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013). Así, la inhibición de *miR-21* aumentó la apoptosis de células germinales (Niu *et al.*, 2011) mientras que la sobre-expresión de *miR-20* o *miR-106a* incrementó la tasa de proliferación de las SSCs (Hu *et al.*, 2013).

Las SSCs de los testículos adultos de ratón están sometidas a una serie de divisiones mitóticas que generan espermatogonias indiferenciadas

1. INTRODUCCIÓN

(de Rooij & Russell, 2000). El ácido retinoico (RA, *retinoic acid*) induce la diferenciación de estas espermatogonias (Snyder *et al.*, 2010) así como su entrada en meiosis (Barrios *et al.*, 2010). La exposición de las espermatogonias al RA disminuye la expresión de ciertos miRNAs, incluyendo a los *clusters miR-17-92* y *miR-106a-363* (Tong *et al.*, 2012), al *cluster miR-221-222* (Yang *et al.*, 2013), y a *miR-146* (Huszar & Payne, 2013), indicando que son necesarios para mantener las espermatogonias en estado indiferenciado. Por el contrario, el RA aumenta la expresión de los miRNAs de la familia *let-7* en espermatogonias, a través de la supresión de *Lin28* (Tong *et al.*, 2011).

Por último, los miRNAs también están implicados en la regulación de las últimas etapas de la espermiogénesis, principalmente en la conversión de la cromatina nucleosomal a cromatina no nucleosomal compacta que tiene lugar durante la elongación de las espermátidas. En este caso, se encargan de regular las proteínas de empaquetamiento de la cromatina, como las protaminas (PRM1, PRM2; (Miller *et al.*, 2010)) y las proteínas de transición (TNP1, TNP2; (Adham *et al.*, 2001; Meistrich *et al.*, 2003)), y la expresión del factor de choque térmico 2 (HSP2) (Björk *et al.*, 2010). Por ejemplo, *miR-18* regula post-transcripcionalmente a HSP2 (Björk *et al.*, 2010), *miR-469* inhibe la expresión de los mRNA de TNP2 y PRM2 (Dai *et al.*, 2011), y *miR-122a* se une a la región 3'UTR de TNP2, provocando la rotura del mRNA (Yu *et al.*, 2005).

1.5.3 *miR-17-92* (MirC1) y *miR106b-25* (MirC3)

El *cluster miR-17-92*, también conocido como MirC1, es un gen policistrónico que codifica seis miRNAs: *miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-20a*, *miR-19b-1* y *miR-92-1* y se localiza en el cromosoma 13 de humanos y en el cromosoma 14 de ratón (He *et al.*, 2005; Olive *et al.*, 2010). Estos miRNAs están muy conservados en vertebrados y se expresan prácticamente en todos los tejidos analizados durante las etapas embrionarias y postnatales (Ventura *et al.*, 2008; Thomson *et al.*, 2004; Suh *et al.*, 2004). En el testículo, *miR-17-92* se expresa en las células germinales primordiales (PGCs) y en las espermatogonias (Hayashi *et al.*, 2008), y como se ha comentado en la sección anterior, es desregulado durante la diferenciación

de las espermatogonias inducida por el ácido retinoico (RA) (Tong *et al.*, 2012).

En humanos y ratones, existen dos *clusters* parálogos de *miR-17-92*, el *cluster miR-106a-363* o *MirC2* que está formado por seis miRNAs, *miR-106a*, *miR-18b*, *miR-20b*, *miR-19b-2*, *miR-92a-2* (situado en el cromosoma X de humanos y ratón) (Ventura *et al.*, 2008) y *miR-363*, y el *cluster miR-106b-25* o también denominado *MirC3*, que consta de tres miembros: *miR-106b*, *miR-93* y *miR-25* (se localiza en el cromosoma 7 en humanos y en el 5 en ratones) (Mendell, 2008; Petrocca *et al.*, 2008a). Al igual que ocurre con *MirC1*, el *cluster MirC3* se expresa en la mayoría de tejidos embrionarios y adultos analizados, incluyendo el testículo. Además, el patrón de expresión de ambos en estos tejidos es muy similar. En cambio, los miembros del *cluster MirC2* no están presentes en los mismos tejidos, indicando que podría ser un pseudogen no funcional. Los miRNAs de estos tres *clusters* tienen secuencias muy similares, y se agrupan en 4 familias según la región semilla, que como se ha comentado anteriormente, es la secuencia de nucleótidos mediante la cual se unen al extremo 3'UTR de sus mRNA diana (Khuu *et al.*, 2016) (Ver Figura 1.2).

El *cluster miR-17-92* también se conoce con el nombre de *Oncomir-1* porque es un potente oncogen asociado a varios tipos de cánceres hematopoyéticos, como el linfoma de células B, leucemia linfocítica crónica de células B y linfoma de células T, y tumores sólidos, incluido el retinoblastoma, cáncer de páncreas y cáncer de mama, entre otros (Ota *et al.*, 2004; Mogilyansky & Rigoutsos, 2013; Matsubara *et al.*, 2007; Hayashita *et al.*, 2005). Durante la oncogénesis, estos miRNAs actúan regulando el ciclo celular y suprimiendo la apoptosis. Además del cáncer, se ha demostrado que el *cluster miR-17-92* desempeña un papel significativo en otras afecciones humanas, incluidas las enfermedades inmunitarias, cardiovasculares y neurodegenerativas, como el Alzheimer (Small & Olson, 2011; Small *et al.*, 2010; Tsitsiou & Lindsay, 2009).

MirC1 se expresa en células embrionarias y juega roles importantes durante el desarrollo. Así, en humanos, las deleciones hemigóticas de *MIR17HG* (*miR-17-92 cluster host gene*), el gen hospedador de *miR-17-92*, se han asociado al síndrome de Feingold, un trastorno autosómico dominante caracterizado por múltiples anomalías esqueléticas (Marrone

1. INTRODUCCIÓN



Figura 1.2: Miembros del cluster *miR-17-92*, sus parálogos y familias: (A) Miembros del cluster *miR-17-92* y sus dos parálogos *miR-106a-363* y *miR-106b-25* y su localización cromosómica. Rojo, miembros de la familia *miR-17*; azul, miembros de la familia *miR-18*; verde, miembros de la familia *miR-19*; naranja, miembros de la familia *miR-92*. (B) Secuencias de los miRNAs del cluster MirC1 (en negrita) y sus dos parálogos MirC2 y MirC3. Las secuencias se dividen en cuatro familias según la región “semilla” del miRNA (secuencia que abarca las posiciones 2-7 contando desde el extremo 5’ del miRNA). La “semilla” en cada caso se muestra en negrita y está resaltada en azul. Imagen tomada de (Mogilyansky & Rigoutsos, 2013)

et al., 2014). Además, los ratones homocigotos mutantes para *miR-17-92* mueren al nacer debido a defectos pulmonares e hipoplasia cardíaca (Ventura *et al.*, 2008), y reproducen parcialmente algunas de las anomalías esqueléticas del síndrome de Feingold (de Pontual *et al.*, 2011). Este *cluster* de miRNAs también están implicado en el desarrollo de las células B y T (Ventura *et al.*, 2008), la diferenciación de las células madre neurales (Bian *et al.*, 2013) y la hendidura orofacial (Wang *et al.*, 2013a).

En los testículos, diversos estudios han demostrado que los componentes del *cluster miR-17-92* se expresan en las células germinales y cuando se inactiva específicamente en este tipo celular causa defectos espermatogénicos, pero la fertilidad no resulta afectada y el tamaño de las camadas es similar al de los controles (Tong *et al.*, 2012). Del mismo modo, la ablación de *MirC1* en el testículo adulto origina alteraciones en la espermatogénesis, reduciendo la producción de esperma, sin embargo, los ratones continúan siendo fértiles (Xie *et al.*, 2016).

La delección específica de la enzima RNase III Dicer en células de Sertoli, reveló que los miRNAs también juegan un papel importante en el desarrollo y la supervivencia de estas células (Kim *et al.*, 2010; Papaioannou *et al.*, 2009). Varios estudios han evidenciado de que los miembros del *cluster miR-17-92* se expresan en SC. Así, Papaioannou *et al.* (2009) consiguieron clonar todos los miRNAs que componen este *cluster* a partir de SC purificadas de un testículo P6, y los análisis posteriores del transcriptoma de RNAs pequeños de estas mismas células, revelaron niveles altos de expresión de *miR-19a* y *miR-19b*, niveles intermedios de *miR-17* y *miR-20a* y bajos niveles de *miR-18a* y *miR-92a* (Ortogerero *et al.*, 2013). Además, mediante hibridación *in situ* con LNA (*Locked Nucleic Acid*) en testículos adultos, se detectó expresión para *miR-17* y *miR-20a* en las SC (Tong *et al.*, 2012)

En general, los datos disponibles muestran que los miRNAs son necesarios para el desarrollo normal de las SCs y que la expresión de *miR-17-92* en células germinales participa en el mantenimiento de la espermatogénesis, pero actualmente no se conoce el papel de este *cluster* en SC postnatales y adultas, siendo éste el segundo objetivo propuesto en esta tesis doctoral.

Para inducir la ablación de *miR-17-92* específicamente en las células de Sertoli, hemos utilizado de nuevo el sistema de mutagénesis *Cre-LoxP*,

1. INTRODUCCIÓN

en este caso la recombinasa Cre se encuentra bajo el control del promotor de *Amb*, de forma que *MirC1* será eliminado condicionalmente de las SC poco después del momento de determinación del sexo.

Al igual que el *cluster MirC1*, los componentes de *MirC3* están sobre-expresados en varios tipos de cáncer, como cáncer gástrico (Petrocca *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2017a), carcinoma hepatocelular (Li *et al.*, 2009), adenocarcinoma esofágico (Kan *et al.*, 2009), neuroblastoma (Wang *et al.*, 2010), cáncer de próstata (Poliseno *et al.*, 2010) y cáncer de mama (Guarnieri *et al.*, 2018), por lo que el *cluster miR-106b-25* también es considerado un proto-oncogén.

Por otro lado, los miRNAs de este *cluster* se han relacionado con el crecimiento y el mantenimiento de células madre/progenitoras. Su expresión se ha detectado en las células madre bronquioalveolares del pulmón de ratón (Qian *et al.*, 2008), en las células madre/progenitoras neuronales (Brett *et al.*, 2011) y en los progenitores de nefronas (Ho *et al.*, 2011). Además, estos miARNs pueden promover la reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón para inducir células madre pluripotentes (Li *et al.*, 2011).

MiR-106b-25 también se expresa en los tejidos embrionarios y adultos, incluido el testículo, igual que su parálogo *MirC1*, pero en esta ocasión los ratones KO para *MirC3* tienen un desarrollo normal y los individuos son viables y fértiles. Sin embargo cuando se eliminan a la vez los *clusters MirC1* y *MirC3*, los ratones presentan un fenotipo más severo que el KO *miR-17-92*, indicando que ambos *clusters* cooperan funcionalmente en la regulación del desarrollo embrionario y la apoptosis en ratón (Ventura *et al.*, 2008).

El papel de este *cluster* en el testículo es bastante desconocido. Hasta el momento, se sabe que *miR-106b-25* se expresa junto a *miR-17-92* en células germinales primordiales y en espermatogonias, además, en este último tipo celular la expresión de los miRNAs disminuye a medida que las células entran en meiosis (Tong *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2013), y se ha demostrado que tras la ablación de *MirC1* condicionalmente en las células germinales, aumenta notablemente la expresión de *MirC3* en el mismo tipo celular, compensando parcialmente su función, mostrando así que los miRNAs de ambos *clusters* tienen redundancia funcional en la

regulación de la espermatogénesis (Tong *et al.*, 2012), sin embargo no se ha descrito ninguna anomalía en el desarrollo y función testicular de los ratones KO *miR-106b-25* (Ventura *et al.*, 2008), probablemente, porque al ser individuos fértiles no se ha prestado atención a estos procesos. Por tanto, el último objetivo que nos hemos propuesto en esta tesis doctoral es el de estudiar en detalle la función del *cluster MirC3* en el testículo, y para ello hemos utilizado ratones KO *miR-106b-25*.

1.6 Sistema de mutagénesis dirigida CRE-LoxP

El sistema CRE/LoxP es una herramienta de edición génica muy poderosa que permite generar ratones *knockout* de genes específicos, en tejidos concretos y en un momento determinado.

La **recombinasa CRE** es una proteína de 38 kDa que está codificada por el bacteriófago P1 y cataliza la recombinación entre dos secuencias de DNA específicas (Sauer & Henderson, 1988). Esta enzima pertenece a la familia de las Tirosina-recombinasas (Nunes-Düby *et al.*, 1998). CRE tiene dos funciones críticas en el ciclo de vida del bacteriófago P1, por un lado sirve para circularizar su DNA después de la infección (Hochman *et al.*, 1983; Segev & Cohen, 1981) y por otro, mejora la estabilidad del plásmido de P1 en la bacteria eliminando los dímeros plasmídicos formados por la recombinación homóloga tras la replicación del mismo (Austin *et al.*, 1981).

CRE reconoce una secuencia nucleotídica de 34 pares de bases (pb) llamada sitio loxP (*locus of X-over of P1*). CRE actúa formando un enlace covalente DNA-recombinasa transitorio para unir los dos sitios LoxP y mediar la recombinación específica de sitio. Según la orientación de los dos sitios LoxP, el segmento de DNA entre ellos será escindido, invertido o translocado (Nagy, 2000) (Figura 1.3).

La **secuencia loxP** tiene 34pb y está compuesta por un núcleo de 8pb que determina la orientación, conocido como sitio de "*crossing-over*", y está flanqueado a cada lado por una secuencia palindrómica de 13pb que contiene dos elementos de unión de la recombinasa CRE (RBes, *recombinase binding elements*) (Hoess & Abremski, 1985). Los sitios

1. INTRODUCCIÓN

loxP son muy comunes en los genomas de bacteriófagos, sin embargo, es estadísticamente improbable que esta secuencia concreta de 34pb aparezca de forma natural en el genoma de ratón, pero se pueden insertar mediante mutagénesis dirigida en las células madre. Las secuencias flanqueadas por sitios loxP se dice que están "floxeadas".

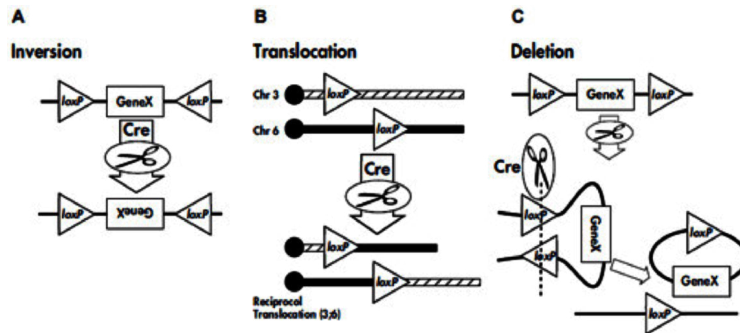


Figura 1.3: Sistema CRE/LoxP: **A:** Si las repeticiones tienen orientación opuesta, el segmento de DNA flanqueado se invierte y los dos sitios LoxP se conservan. **B:** Cuando los sitios LoxP se encuentran en cromosomas distintos, la recombinasa CRE media una translocación cromosómica. **C:** Cuando los dos sitios loxP están en la misma orientación, CRE escinde el segmento de DNA comprendido entre ellos, y se conserva un único sitio loxP (Tomado de <http://cre.jax.org>)

La estrategia para generar ratones mutantes condicionales mediante este sistema requiere dos líneas de ratones transgénicas, una de ellas que contenga el gen de la recombinasa CRE bajo el control de promotores específicos de tejido, de tipo celular o de forma regulada por el desarrollo, y otra línea que contenga el gen de interés flanqueado por dos sitios loxP ("gen floxeado") dispuestos en la misma orientación. Cuando se cruce ambas líneas transgénicas, algunos de los descendientes heredarán el gen floxeado y el transgén que contiene a la recombinasa CRE, de modo que el fragmento de DNA flanqueado por los sitios loxP será eliminado y por tanto el gen diana quedará inactivo en aquellos tejidos donde el promotor permita la expresión de *Cre*, permaneciendo activo en los tejidos o células donde no se expresa la recombinasa, generando así un individuo *knockout*

(KO) condicional-espacial (Nagy, 2000; Gu *et al.*, 1993).

Un avance técnico muy importante fue el desarrollo de recombinasas CRE inducibles, de forma que se puede controlar el momento de la inactivación génica mediante la administración del ligando, generando un KO condicional-espacial-temporal (Kühn *et al.*, 1995). Uno de estos sistemas es el de recombinasas CRE dependiente de tamoxifeno, denominadas *CreER* (Brocard *et al.*, 1998). En estos casos, la recombinasa CRE está fusionada a una versión modificada del receptor de estrógenos humano, que no reconoce a su ligando endógeno (17- β -estradiol) porque tiene alterada la estructura proteica, pero sí tiene la capacidad de unirse a un ligando sintético análogo de estrógenos, el 4-hidroxitamoxifeno (TX). De esta forma, la recombinasa CRE no sólo se expresará en los tejidos indicados por el promotor si no que la enzima permanecerá en el citoplasma de las células y sólo cuando se administre el TX al ratón, éste se unirá al receptor y permitirá la translocación de CRE al núcleo celular para ejercer su función (Feil *et al.*, 1996). *CreERT2* es una versión modificada y más eficiente que *Cre-ER*.

1. INTRODUCCIÓN

2. Objetivos

- Estudiar la función de los genes *Sox9* y *Sox8* en el testículo adulto de ratón.
 - Generar ratones mutantes condicionales e inducibles para *Sox9* y *Sox8* en células de Sertoli adultas.
 - Caracterizar a nivel morfológico, histológico y molecular los testículos de los ratones dobles mutantes *Sox9/8*.
 - Analizar el transcriptoma testicular de los ratones dobles mutantes *Sox9/8*.
- Identificar el papel del *cluster miR-17-92* durante el desarrollo y función de las células de Sertoli.
 - Generar ratones mutantes condicionales para el *cluster miR-17-92* específicamente en células de Sertoli.
 - Caracterizar a nivel morfológico, histológico y molecular los testículos de los ratones mutantes con una ablación del *cluster miR-17-92* en células de Sertoli.
 - Analizar el transcriptoma testicular de ratones en los que el *cluster miR-17-92* se ha delecionado específicamente en células de Sertoli.
- Caracterizar la función del *cluster miR-106b-25* durante el desarrollo y función del testículo de ratón.
 - Caracterizar a nivel morfológico, histológico y molecular los testículos de los ratones mutantes para el *cluster miR-106b-25*.
 - Analizar el transcriptoma testicular de los ratones mutantes para el *cluster miR-106b-25*.

2. OBJETIVOS

- A partir de los datos transcriptómicos identificar posibles genes diana de los miembros individuales del *cluster miR-106b-25*.

3. Material y Métodos

3.1 Material analizado

3.1.1 Líneas transgénicas y protocolo de cruces

Todos los ratones utilizados para este estudio y los experimentos realizados con ellos, así como su alojamiento y manipulación se han realizado de acuerdo con las directrices y normas pertinentes dictadas por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Granada (exp. n.º: 2011-341), respetando en todo momento el principio de las tres erres: Reemplazo, Reducción y Refinamiento (Russell *et al.*, 1959).

Generación de ratones mutantes *Sox9/8*

Para investigar el papel de *Sox9* en la gónada adulta, hemos utilizado los ratones *Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}* generados previamente por Barrionuevo *et al.* (2009) a partir de las líneas transgénicas *Sox9^{f/f}* (Kist *et al.*, 2002), que tiene flanqueados los exones segundo y tercero por sitios loxP, y *Sox8^{-/-}* (Sock *et al.*, 2001), que tiene la secuencia del gen *Sox8* interrumpida por un cassette con parte de la región codificante de *LacZ* y *Neo* y resulta en una proteína no funcional, y como se ha comentado en la introducción, son ratones completamente fértiles hasta los 5 meses de edad. Con la finalidad de inducir la mutación de *Sox9* en las células de Sertoli de la gónada, hemos utilizado dos líneas de ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el control de dos promotores específicos de este tipo celular: *Wt1-CreERT2* (Zhou *et al.*, 2008) y *Sox9-CreERT2* (Kopp *et al.*, 2011). En ambos casos CRE es inducible por tamoxifeno, lo que nos permitió delecionar el gen *Sox9* en ratones adultos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Inicialmente, cruzamos los ratones $Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}$ con la línea $Wt1-CreERT2$ y los individuos doble heterocigotos que contenían el alelo Cre , los retrocruzamos con $Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}$, generando así ratones mutantes condicionales doble homocigotos para $Sox8$ y $Sox9$ y sus genotipos intermedios. Con la línea $Sox9-CreERT2$ llevamos a cabo el mismo protocolo de cruces. Así, las líneas de ratones generadas fueron las siguientes:

- $Wt1-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}$
- $Sox9-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}$

Además, para comprobar la eficiencia y actividad de la recombinasa CRE, cruzamos los ratones $Wt1-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}$ con una línea transgénica reportera, que lleva el alelo $R26R-EYFP$ (Srinivas *et al.*, 2001). En este caso, la secuencia codificante de EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) está precedida por el cassette $PKG-Neo-Stop$, que contiene una señal de terminación de la transcripción y está flanqueado por secuencias loxP. Esta construcción está insertada en el locus *Rosa 26*, un gen que se expresa de forma ubicua (Soriano, 1999; Mao *et al.*, 1999). La acción de CRE elimina el cassette permitiendo la expresión de EYFP en las mismas células donde actúa la recombinasa, en nuestro caso en las células de Sertoli.

Generación de ratones mutantes *miR-17-92*

En esta ocasión, para estudiar la función del *cluster miR-17-92* en las células de Sertoli postnatales y adultas, hemos cruzado ratones que tienen la secuencia de *miR-17-92* floxeada ($miR-17-92^{f/f}$) (Ventura *et al.*, 2008) con otra línea que expresa la recombinasa CRE bajo el control del promotor del gen *Amh* ($Amh-Cre$) (Holdcraft & Braun, 2004), ambas obtenidas de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA; Stock No: 007915 y 008458, respectivamente). Esta recombinasa no es inducible, sino que su expresión depende del promotor, así CRE se expresará en las células de Sertoli en E13.5, que es cuando lo hace *Amh*. Los descendientes heterocigotos portadores del transgén CRE los cruzamos con ratones

homocigotos *miR-17-92^{fllox}* para obtener la siguiente línea de ratones transgénicos:

- *Amh-Cre;miR-17-92^{f/f}*

De nuevo, para evaluar la actividad de CRE, cruzamos los ratones anteriores con una línea reportera, esta vez la línea *R26R-LacZ* (Soriano, 1999) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA; Stock No: 003309). Al igual que antes, el gen reportero está integrado en el locus *Rosa 26*, y la secuencia codificante de la β -galactosidasa tiene delante el cassette *PKG-Neo-Stop*, descrito anteriormente.

Ratones mutantes *miR-106b-25*

Por último, para examinar el papel de este *cluster* en el testículo, hemos utilizado la línea de ratón generada por Ventura *et al.* (2008), *miR-106b-25^{-/-}*, comprada de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA; Stock No: 008460). Esta línea tiene la secuencia del *cluster MirC3* delecionada de forma constitutiva.

3.1.2 Destete e identificación/marcaje de ratones

Las crías resultantes de cada cruce fueron destetadas entre los 22-30 días, dependiendo de la línea de ratones, y separadas por sexos en diferentes cubetas. Posteriormente, marcamos cada individuo colocando una anilla identificativa (Bionic; ref. 24220-50) en la oreja y obtuvimos una sección de la cola de aproximadamente 3-4 mm para el genotipado (ver **Métodos de análisis molecular**. Página 70).

3.2 Métodos

3.2.1 Obtención de tejidos

Los ratones juveniles y adultos se sacrificaron por dislocación cervical, se pesaron y se diseccionaron para extraer las gónadas, de algunos individuos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

machos también se extirparon las vesículas seminales. A continuación, los órganos fueron pesados y procesados dependiendo del experimento. Así, algunas gónadas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y otras se fijaron para su posterior inclusión en parafina.

Otras muestras recolectadas fueron sangre, mediante punción cardíaca, justo tras la muerte del ratón, para hacer un análisis de hormonas, y líquido seminal, a partir de los epidídimos, para llevar a cabo el recuento de espermatozoides.

Para obtener las gónadas embrionarias en E15.5, tuvimos que hacer un seguimiento de los cruces y determinar el día de la cópula mediante visualización de la placa vaginal, considerando el momento de la observación como E0.5. Posteriormente, las hembras preñadas se sacrificaron y los embriones fueron disecados para extraer sus gónadas. En este estadio, las gónadas están suficientemente desarrolladas como para determinar el sexo de los embriones mediante inspección visual (presencia de cordones sexuales en el macho y ausencia en la hembra).

3.2.2 Métodos histológicos

Procesamiento del material para histología

El primer paso para la realización de cortes histológicos es la fijación del órgano, de forma que se conserve el estado físico y químico del tejido, posteriormente se deshidrata y finalmente se incluye en parafina, tal como se describe a continuación:

Fijación. Tras la disección, las gónadas se disponen en cassettes y se fijan en SERRA durante un máximo de 24 horas, en agitación y a 4 °C, favoreciendo que la solución penetre en todo el tejido.

Deshidratación e inclusión. Una vez que la pieza está fijada, se eliminan los restos de fijador y se sumerge en etanol al 70 %.

Posteriormente, las muestras se deshidratan y aclaran en el procesador automático de tejidos LEICA TP1020. El protocolo es el siguiente:

- Etanol al 70 % 90 min
- Etanol al 80 % 90 min
- Etanol al 96 % 90 min
- Etanol absoluto 60 min
- Etanol absoluto 60 min
- Etanol absoluto 60 min
- Xileno 90 min
- Xileno 120 min
- Parafina 120 min
- Parafina 120 min

Al finalizar el programa, las muestras se mantienen en parafina líquida hasta que se orientan y se hacen los bloques, utilizando el sistema modular de inclusión de tejidos LEICA EG1150C. Posteriormente, se almacenan a 4 °C hasta su uso.

Cortes histológicos y montaje de preparaciones Las piezas incluidas se cortan de forma seriada en secciones de 5-6 μm utilizando el microtomo de rotación SLEE CUT 6062 y se guardan en cajas.

Por último, los cortes se montan sobre portaobjetos tratados con polilisina (VWR, Belgium, ref. 631-0107) a los que previamente se les ha añadido H_2O bidestilada y se han colocado sobre una placa termoestática a 40 °C. Transcurridas 24 horas, las preparaciones debidamente identificadas se almacenan en el frigorífico hasta su utilización.

Tinción con Hematoxilina-Eosina

Mediante esta técnica, los núcleos de las células, que son ácidos, se tiñen de color violeta, porque tienen afinidad por la Hematoxilina, mientras que los citoplasmas (básicos) tienen afinidad por la Eosina y se tiñen de color rosado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- Calentar las preparaciones a 60 °C durante 20 minutos para que se funda la parafina.
- Desparafinar aplicando 2 lavados de Xileno de 10 minutos cada uno.
- Rehidratar las muestras mediante baños en alcoholes de concentración decreciente: EtOH 100 % (2 × 5 minutos), 96 % (1 × 5 minutos), 70 % (1 × 5 minutos) y 50 % (1 × 5 minutos).
- Lavar con H₂O destilada.
- Teñir con Hematoxilina durante 30 segundos (el tiempo puede variar en función del estado de la solución).
- Virar el colorante de violeta claro a violeta oscuro mediante baño en H₂O corriente durante 5 minutos.
- Lavar con H₂O destilada.
- Teñir con Eosina durante 90 segundos (este tiempo también varía según el estado del colorante).
- Deshidratar las preparaciones usando una serie de alcoholes de concentración creciente (EtOH 50 %, 70 %, 96 % y 100 %) durante 5-6 segundos en cada solución. El tiempo utilizado es el mínimo posible para no perder la tinción con Eosina.
- Sumergir en Xileno durante 1 minuto.
- Aplicar el medio de montaje DPX (SIGMA; ref. 44581) y colocar un cubreobjetos. Dejar solidificar.

Tinción LacZ

Esta técnica nos permite detectar la expresión del gen reportero *LacZ* marcando de color azul las células que tienen activa la β -galactosidasa (Burn, 2012). El protocolo se describe a continuación:

- Tras la disección, lavar las gónadas en PBS 1× y sumergirlas en la siguiente solución fijadora:

- Glutaraldehído 0.2 %
- EGTA 5 mM
- MgCl_2 2 mM
- en buffer fosfato 0.1 M (pH=7.3)
- Fijar las muestras durante 45 minutos en agitación y en hielo.
- Lavar las gónadas 3×15 minutos en hielo con la solución de lavado:
 - Igepal 0.02 %
 - Deoxicolato sódico 0.01 %
 - MgCl_2 2 mM
 - en buffer fosfato 0.1 M (pH=7.3)
- Preparar la solución de tinción X-Gal y mantener en oscuridad a 37°C hasta su uso:
 - Igepal 0.02 %
 - Deoxicolato sódico 0.01 %
 - MgCl_2 2 mM
 - Ferrocianuro de Potasio 5 mM
 - Ferricianuro de Potasio 5 mM
 - en buffer fosfato 0.1 M (pH=7.3)
 - Añadir X-Gal 1mg/ml justo antes de utilizar la solución
- Introducir las gónadas en la solución anterior y dejar teñir durante toda la noche a 37°C , mantener en oscuridad y con agitación.
- Dar varios lavados de PBS $1\times$, durante 2 horas aproximadamente en frío.
- Hacer una postfijación de las muestras con PFA al 4% en PBS a 4°C durante 24 horas.
- Deshidratar e incluir en parafina como se ha descrito anteriormente para poder seccionar el tejido.
- Una vez que hayamos montado las preparaciones se puede hacer una contratinción con Eosina durante 1 minuto.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.3 Métodos inmunológicos

Inmunofluorescencia indirecta

Esta técnica permite detectar la presencia o ausencia de proteínas en un tejido mediante el uso de anticuerpos específicos. La señal se obtiene gracias a un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo que se une al anticuerpo primario, pudiendo así estudiar el patrón de expresión de multitud de genes. Las preparaciones se visualizaron y fotografiaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti.

- Calentar las preparaciones en una placa termoestable estabilizada a 60 °C hasta que la parafina se haga líquida (aproximadamente 20 minutos).
- Desparafinar aplicando 2 lavados de Xileno de 10 minutos cada uno.
- Rehidratar las muestras en una serie de alcoholes mayor a menor graduación (EtOH 100 % (2 pases), 75 % y 50 %) dejándolas 5 minutos en cada uno.
- Hacer 2 lavados con PBST (Tween20 al 0,1 % en PBS 1×) de 5 minutos cada uno.
- Recuperación de antígeno: Transferir las preparaciones a un recipiente que contenga 500 ml del buffer Tris-EDTA pH=9 (Para 500 ml, añadir 2.2 g de tris-base, 0.86 g de EDTA y 200 μ l de Tween20 al 50 %) y calentar en el microondas a máxima potencia durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se reestablece el nivel de agua evaporada añadiendo 100 ml de H₂O destilada y se vuelve a calentar a máxima potencia durante otros 10 minutos.
- Dejar enfriar unos 20-30 minutos a temperatura ambiente (RT, *room temperature*).
- Lavar las preparaciones dos veces con PBST durante 10 minutos cada una.

- Bloquear el tejido con suero al 10% en PBST de la especie en la que se haya sintetizado el/los anticuerpo/s secundario/s. Introducir las preparaciones en una cámara húmeda, añadir la solución de bloqueo y cubrir con parafilm para que la superficie del porta quede impregnada. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Preparar la dilución adecuada del anticuerpo primario en PBST (ver cuadro 3.1), añadir a la preparación y cubrir con parafilm. Incubar en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche. En el caso de inmunofluorescencias dobles o triples, añadir todos los anticuerpos primarios en este paso, teniendo en cuenta que cada uno de ellos debe estar hecho en una especie distinta y su dilución óptima.
- Lavar 3 veces en PBST dejándolas 10 minutos en cada uno.
- Preparar la dilución del anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo a una concentración 1:150-1:200, dependiendo del anticuerpo (ver cuadro 3.2). También se agrega a la dilución DAPI 1× (4',6-diamino-2-fenilindol), un marcador fluorescente que se excita con luz ultravioleta y se une al DNA, tiñendo los núcleos celulares. Añadir a la preparación, cubrir con parafilm e incubar 1 hora a RT en cámara húmeda.
- Realizar 3 lavados con PBST en oscuridad de 10 minutos cada uno.
- Añadir 150-200 μ l de Sudan Black B al 0.1% para eliminar la autofluorescencia del tejido (Sun *et al.*, 2011). Cubrir la preparación con parafilm, e incubar en cámara húmeda 10 minutos a RT.
- Lavar las preparaciones dos veces con PBST en oscuridad durante 5 minutos cada una.
- Montar con Vectashield (Vector; ref. H-1000) y observar al microscopio de fluorescencia.

La observación de las preparaciones y las fotomicrografías se hicieron con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti equipado con una cámara digital Nikon DS-U3 a una resolución de 2560 × 1920 píxeles, utilizando la versión *Nis-Elements-AR 4.10.03.64bit*. Algunas

3. MATERIAL Y MÉTODOS

imágenes de inmunofluorescencia se editaron mediante la herramienta de niveles de color del software de edición de imágenes *Gimp* para mejorar el contraste y minimizar la fluorescencia inespecífica del fondo.

Proteína	Fuente del anticuerpo	Dilución de trabajo	Referencia
LAMININA	conejo	1:100	Sigma, L9393
ACTA2	ratón	1:200	Sigma, A2547
CLAUDINA 11	conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology, CA sc-25711
DMC1	cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology, CA sc-8973
PCNA	ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology, CA sc-56
CYP14A1 (P450scc)	cabra	1:200	Santa Cruz Biotechnology, CA sc-18043
SOX9	conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology, CA sc-20095
SOX9	cabra	1:10	Santa Cruz Biotechnology, CA sc-17341
SOX9	conejo	1:500	Merck Millipore, AB5535
WT1	conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology, CA sc-192
WT1	ratón	1:30	DAKO, M3561 (clon 6F-H2)
FOXL2	cabra	1:100	Abcam, ab5096
GFP	conejo	1:100	Novus Biologicals, NB600-308
CYP19A1 (Aromatasa)	ratón	1:10	GeneTex, GTX41561
DMRT1	conejo	1:400	cedido por Dr. Silvana Guioli

Cuadro 3.1: Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Origen	Dilución de trabajo	Conjugado	Referencia
Anti-conejo (IgG)	burro	1:200	Alexa fluor 555	Invitrogen, A31572
Anti-ratón (IgG)	burro	1:150	Alexa fluor 405	Abcam, ab175658
Anti-cabra (IgG)	burro	1:200	Alexa fluor 488	Invitrogen, A11055
Anti-ratón (IgG)	burro	1:200	Alexa fluor 555	Invitrogen, A31570
Anti-conejo (IgG)	cabra	1:200	Alexa fluor 488	Invitrogen, A11008
Anti-conejo (IgG)	cabra	1:150	Alexa fluor 555	Invitrogen, A21429
Anti-ratón (IgG)	cabra	1:200	Alexa fluor 488	Invitrogen, A11001
Anti-ratón (IgG)	cabra	1:200	Alexa fluor 555	Invitrogen, A21424
Anti-cabra (IgG)	conejo	1:200	Alexa fluor 555	Invitrogen, A21431

Cuadro 3.2: Anticuerpos secundarios utilizados

Experimento de permeabilidad de la BTB

Con este método podemos estudiar *in vivo* la funcionalidad de la barrera hematotesticular (Dadhich *et al.*, 2013).

El protocolo se describe a continuación:

- En primer lugar los ratones son anestesiados con una mezcla de Ketamina (50-100mg/kg) y Medetomidina (0.5-1mg/kg) mediante inyección intraperitoneal.
- Disolver 1 mg de EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin 10 mg/ml (Thermo-Fisher scientific; ref. 21335) en 100 μ l de PBS 1 \times con CaCl₂ 1 mM.
- Posteriormente, se hace una incisión en la zona abdominal para extraer el testículo, y se inyectan unos 20 μ l de trazador bajo la túnica albugínea en diferentes puntos de la gónada izquierda. En el testículo derecho se inyecta la misma cantidad de PBS 1 \times con CaCl₂ 1 mM, como control. Después los testículos se devuelven a su posición.
- Pasados 30 minutos desde la inyección del trazador, los ratones son sacrificados por dislocación cervical y las gónadas se fijan en SERRA durante 24 horas.
- El material ya se puede procesar como se ha descrito en los métodos histológicos, para finalmente incluirlo en parafina, hacer secciones de 5-6 μ m y montar preparaciones.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El siguiente paso consiste en la detección del trazador con un anticuerpo fluorescente. Para ello:

- Calentar las preparaciones en estufa a 60 °C hasta que la parafina se haga líquida (aproximadamente 20 minutos).
- Desparafinar aplicando 2 lavados de Xileno de 10 minutos cada uno.
- Rehidratar las muestras en una serie de alcoholes graduación decreciente (EtOH 100 % (2 pases), 75 % y 50 %) dejándolas 5 minutos en cada uno.
- Hacer 2 lavados con PBST (Tween20 al 0,1 % en PBS 1×) de 5 minutos cada uno.
- Recuperación de antígeno: Transferir las preparaciones a un recipiente que contenga 500 ml del buffer Tris-EDTA pH=9 (Para 500 ml, añadir 2.2 g de tris-base, 0.86 g de EDTA y 200 μ l de Tween20 al 50 %) y calentar en el microondas a máxima potencia durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se reestablece el nivel de agua evaporada añadiendo 100 ml de H₂O destilada y se vuelve a calentar a máxima potencia durante otros 10 minutos.
- Dejar enfriar unos 20-30 minutos a temperatura ambiente (RT, *room temperature*).
- Lavar las preparaciones dos veces con PBST durante 10 minutos cada una.
- Preparar una dilución 1:1000 del anticuerpo Alexa Fluor 568 conjugado con estreptavidina (Invitrogen; ref. S11226). Añadir la solución, cubrir con parafilm e incubar en cámara húmeda durante 30 minutos a RT.
- En el caso de hacer una detección doble, por ejemplo trazador y CLAUDINA 11, el anticuerpo primario se añade previamente, lavando después con PBST, y el anticuerpo secundario se incorpora junto al anticuerpo conjugado con estreptavidina.
- Lavar 3 veces con PBST en oscuridad durante 10 minutos cada una.

- Añadir 150-200 μl de Sudan Black B al 0.1 %. Cubrir la preparación con parafilm, e incubar en cámara húmeda 10 minutos a RT.
- Lavar las preparaciones 2 veces con PBST en oscuridad durante 5 minutos cada una.
- Incubar con 100 μl de DAPI 1 \times durante 10 minutos en cámara húmeda.
- Hacer 2 lavados con PBST de 5 minutos cada uno en oscuridad.
- Montar con Vectashield (Vector; ref. H-1000) y observar al microscopio de fluorescencia.

TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

Este ensayo nos permite detectar células apoptóticas gracias a la actividad de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal, que cataliza la adición de nucleótidos dUTP, marcados con un fluoróforo a los extremos 3' libres del DNA fragmentado por las nucleasas. Para ello hemos utilizado el kit "Fluorescent In Situ Cell Death Detectio" (Roche; ref. 11684795910)

El protocolo se detalla a continuación:

- Desparafinar y rehidratar las muestras como se ha descrito en el protocolo anterior.
- Lavar 2 veces con PBST (Tween20 al 0,1 % en PBS 1 \times) de 5 minutos cada una.
- Tratamiento con proteinasa K (preparar en H₂O bidestilada):
 - Tris-HCl 10 mM pH=7.5
 - EDTA 1 mM pH=8
 - Tritón 0.1 %
 - Proteinasa K 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$
- Incubar durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- Lavar 3 veces con PBST durante 5 minutos cada una.
- Preparar la reacción de TUNEL: 45 μl de *label solution* y 5 μl de *enzyme solution*, mezclar por pipeteo y añadir a la preparación. Cubrir con parafilm e incubar en cámara húmeda y en oscuridad durante 90 minutos a 37 °C.
- Lavar las preparaciones 3 veces con PBST en oscuridad durante 5 minutos cada una.
- En el caso de hacer una detección doble, el anticuerpo primario se añade en este punto, se deja incubar toda la noche a 4 °C, y se lava con PBST al día siguiente. Posteriormente se agrega el anticuerpo secundario como se ha descrito en el protocolo de Inmunofluorescencia Indirecta.
- Añadir 150 μl de Sudan Black B al 0.1 %. Cubrir la preparación con parafilm, e incubar en cámara húmeda 10 minutos a RT.
- Dar 2 lavados con PBST en oscuridad durante 5 minutos cada uno.
- Añadir 100 μl de DAPI 1 \times , cubrir con parafilm e incubar durante 10 minutos en cámara húmeda.
- Hacer 2 lavados con PBST de 5 minutos cada uno en oscuridad.
- Montar con Vectashield (Vector; ref. H-1000) y observar al microscopio de fluorescencia.

3.2.4 Métodos de análisis molecular

Extracción de DNA genómico para genotipar

Para la extracción del DNA se siguió el método de (Sambrook *et al.*, 1989) con algunas modificaciones. El material de partida es la sección de cola de ratón de 3-4 mm, que recogíamos al marcar a los individuos destetados con una anilla numerada.

- Colocar el trozo de cola en un tubo de 1.5 ml y añadir 150 μl de tampón de lisis, que se compone de lo siguiente:

- Tris HCl pH=8, 50 mM
 - EDTA pH=8, 10 mM
 - NaCl 100 mM
 - SDS 1 %
 - Proteinasa K 0.5 mg/ml
- Incubar en agitación (~ 800 rpm) a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche.
 - Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos a RT.
 - Coger $50\ \mu\text{l}$ de sobrenadante, transferir a un tubo nuevo y añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío.
 - Mezclar hasta observar el precipitado de DNA, en el caso de no visualizar el DNA, repetir el paso anterior utilizando el mismo tubo.
 - Centrifugar 5 minutos a 13 200 rpm y RT.
 - Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet 10-12 minutos a temperatura ambiente.
 - Añadir H_2O ultrapura en función del tamaño del precipitado y dejar a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas para disolverlo.
 - Mezclar con vórtex y medir la concentración del DNA con un nanofotómetro. Almacenar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Genotipado mediante PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando la Master Mix NZYTaq 2x (Nzytech; ref. MB0400), siguiendo las indicaciones del fabricante:

- Para una reacción de $10\ \mu\text{l}$, se mezclan los siguiente componentes en un tubo de 0.2 ml (mantener en hielo):
 - Master Mix NZYTaq 2x: $5\ \mu\text{l}$

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- Cebadores: 0.2-0.5 μM
 - DNA: 50-100 ng
 - Para la amplificación de *Sox8* se añaden 0.5 μl de DMSO
 - H₂O libre de nucleasas: hasta 10 μl
- Mezclar pipeteando y centrifugar brevemente.
 - Introducir los tubos en el termociclador.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Fases	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min.	1
Desnaturalización	95 °C	45 seg.	30
Alineamiento	59 °C	45 seg.	
Extensión	72 °C	45 seg.	
Extensión final	72 °C	7 min.	1
Mantenimiento	4 °C		∞

Los cebadores utilizados para amplificar cada uno de los alelos se detallan en el cuadro 3.3

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se realizó mediante el sistema de electroforesis submarina en gel (Sharp *et al.*, 1973). Los fragmentos de DNA se separaron en base a su tamaño utilizando geles de agarosa al 2 % en TAE 1 \times aplicando una corriente de 5 V/cm.

Extracción de RNA total

Para extraer el RNA de las gónadas adultas y embrionarias hemos utilizado el “RNeasy Midi kit” (Qiagen; ref. 75144) y el “RNeasy Micro Kit” (Qiagen; ref. 74004) respectivamente. En ambos casos hemos seguido las instrucciones proporcionadas por el fabricante con algunas

Cebadores	Secuencia
Cre-F	5' CCT GGA AAA TGC TTC TGT CCG 3'
Cre-R	5' CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC 3'
Sox9f-F	5' CCG GCT GCT GGG AAA GTA TAT G 3'
Sox9f-R	5' CGC TGG TAT TCA GGG AGG TAC A 3'
Sox8-mut-F	5' GTC CTG CGT GGC AAC CTT GG 3'
Sox8-mut-R1	5' GCC CAC ACC ATG AAG GCA TTC 3'
Sox8-mut-R2	5' TAA AAA TGC GCT CAG GTC AA 3'
R26R-mut-F	5' AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT 3'
R26R-mut-R	5' GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC 3'
R26R-wt-R	5' GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG 3'
MirC1-F	5' TCG AGT ATC TGA CAA TGT GG 3'
MirC1-R	5' TAG CCA GAA GTT CCA AAT TGG 3'
MirC1-del-R	5' ATA GCC TGA AAC CAA CTG TGC 3'
MirC3-F	5' TCC ACT GCT CTG GTG AGT GG 3'
MirC3-mut-R	5' TGC TCC AGC TTC AAG CCT GG 3'
MirC3-wt-R	5' AGC AAG TAC CCA CAG TGC GG 3'

Cuadro 3.3: Cebadores empleados para el genotipado de las líneas transgénicas

3. MATERIAL Y MÉTODOS

modificaciones. Ambos protocolos son muy similares, la diferencia radica en la cantidad del material de partida, siendo superior en el primer kit, como consecuencia el tamaño de las columnas es mayor, y hay que añadir un mayor volumen de reactivos. Al final del proceso también se puede obtener más cantidad de RNA total.

A continuación, se describe el protocolo para el “RNeasy Micro Kit”:

- Limpiar el material que se va a utilizar y el puesto de trabajo con RNase-ExitusPlus (PanReac AppliChem; ref. A7153). Utilizar en todos los pasos tubos y puntas libres de RNasas.
- Sacar la muestra del contenedor de N₂ líquido y mantener en hielo. Actuar con rapidez para evitar degradación.
- Transferir el material a un tubo libre de RNasas y añadir rápidamente 350 μ l de tampón RLT, al que previamente se le ha añadido β -mercaptoetanol en proporción 1:100.
- Homogeneizar las gónadas hasta una total disrupción del tejido, para ello hemos pasado la muestra por agujas de diferentes calibres repetidas veces.
- Centrifugar el lisado a máxima velocidad durante 3 minutos. Recoger cuidadosamente el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo.
- Añadir 1 volumen de EtOH 70 % (fresco) al lisado y mezclar bien por pipeteo. No centrifugar y proceder inmediatamente con el siguiente paso.
- Transferir la muestra en su totalidad a la columna que lleva acoplado un tubo colector y centrifugar durante 30 segundos a 10 000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Añadir 350 μ l del tampón RW1 a la columna y centrifugar a 10 000 rpm durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante.
- Preparar la solución de DNasa I: mezclar 10 μ l de la solución stock de DNasa I y 70 μ l de tampón RDD y pipetear suavemente. Añadir directamente sobre la membrana de la columna e incubar durante 15-30 minutos a temperatura ambiente.

- Añadir 350 μl del tampón RW1 a la columna y centrifugar a 10 000 rpm durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante y el tubo colector.
- Poner la columna en un tubo colector nuevo y añadir 500 μl del tampón RPE a la columna. Centrifugar durante 30 segundos a 10 000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Añadir 500 μl de EtOH 80 % (fresco) a la columna y centrifugar durante 2 minutos a 10 000 rpm. Descartar el sobrenadante y el tubo colector.
- Poner la columna en un tubo colector nuevo y centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos para secar la membrana.
- Repetir el paso anterior.
- Poner la columna en un tubo nuevo libre de RNasas y añadir directamente sobre la membrana 14-20 μl de H_2O libre de nucleasas. Incubar durante 10 minutos.
- Centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad para eluir el RNA.
- Medir la concentración en un instrumento Nanodrop o similar.
- Realizar una electroforesis en gel agarosa al 1 %, cargando aproximadamente 0.5 μg de RNA y comprobar que existen dos bandas de ribosómico, indicador de que el RNA no está degradado.

Para hacer los diferentes transcriptomas, hemos extraído RNA de los siguientes individuos:

- Papel de *Sox9/8* en la gónada adulta:
 - 3 machos adultos mutantes *Wt1-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}* P150 (90 datx)
 - 3 machos adultos mutantes *Sox9-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}* P150 (90 datx)

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- 2 machos adultos *Sox9^{f/f}* tratados con TX P150 (90 datx)
- 2 machos adultos *Sox9^{f/f}* sin tratar P150
- 2 hembras adultas *wild type* P120-P150

- Función de *miR-17-92*:
 - 3 machos adultos mutantes *Amh-Cre;miR17-92^{f/f}* P60
 - 3 machos adultos *miR17-92^{f/f}* P60

- Función de *miR-106b-25* en el testículo:
 - 3 machos adultos mutantes *miR106b-25^{-/-}* P60
 - 3 machos adultos *wild type* P60

Para los análisis de expresión de *miR-17-2hg*, hemos extraído RNA de:

- 3 embriones macho mutantes *Amh-Cre;miR17-92^{f/f}* E15.5
- 3 embriones macho *miR17-92^{f/f}* E15.5

En todos los casos hemos extraído el RNA de las dos gónadas juntas.

RT-PCR cuantitativa

Reacción de transcripción inversa Para obtener el cDNA hemos utilizado el kit "SuperScript II Reverse Transcriptase"(Invitrogen; ref. 18064)

- Para una reacción de 20 μ l, mezclar lo siguiente en un tubo de 0.2 ml:
 - Cebadores aleatorios (*Random primers*) (100 ng/ μ l): 1 μ l
 - RNA (hasta 5 μ g de RNA total): x μ l
 - dNTP Mix (10 mM cada uno): 1 μ l
 - H₂O libre de nucleasas: hasta 12 μ l

- Incubar la muestra durante 5 minutos a 65 °C y enfriar en hielo rápidamente. Centrifugar brevemente.
- Añadir lo siguiente:
 - *First-Strand Buffer* 5×: 4 μ l
 - DTT 0.1 M: 2 μ l
 - RNaseOut (40 unidades/ μ l): 1 μ l
- Mezclar el contenido e incubar durante 2 minutos 25 °C.
- Añadir 1 μ l de SuperScript II RT y mezclar pipeteando.
- Incubar durante 10 minutos a 25 °C.
- Incubar durante 50 minutos a 42 °C.
- Inactivar la reacción incubando a 70 °C durante 15 minutos.
- Almacenar a -20 °C hasta su uso.

Diseño de cebadores para RT-Q-PCR Para diseñar los cebadores, hemos utilizado el programa *Primer3* versión 0.4.4 y hemos chequeado su eficiencia con *Net primer* y *Ensemble blat*. Los oligonucleótidos utilizados están recogidos en el cuadro 3.4.

Cebadores	Secuencia
miR-17-92hg-F	5' GGT GGG GAT TGT GAC CAG 3'
miR-17-92hg-R	5' CGA GCA AAC ACG AAA ATG AA 3'
Gapdh-F	5' GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG 3'
Gapdh-R	5' TCA TAC CAG GAA ATG AGC TTG 3'

Cuadro 3.4: Cebadores utilizados para RT-Q-PCR

PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR) Tras la síntesis de cDNA, realizamos la PCR utilizando la NZY qPCR Green Master Mix 2× (Nzytech; re. MB22101) en el termociclador *CFX Connect Real-Time PCR System* (BIO-RAD, USA).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- Para una reacción de 12 μl , se mezclan los siguiente componentes en un tubo de 0.2 ml (mantener en hielo):
 - Master Mix NZY qPCR Green (2x) 6 μl
 - Cebadores 10 μM : 0.5 μl de cada uno
 - cDNA más H_2O : 5 μl
- Programa del termociclador:

Fases	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Activación de la polimerasa	95 °C	10 min.	1
Desnaturalización	95 °C	15 seg.	40
Alineamiento/Extensión	60 °C	45 seg.	
Lectura de placa al final de cada ciclo			
Curva del Melting al finalizar los 40 ciclos			
Mantenimiento	4 °C		∞

Comprobamos la eficiencia de la amplificación para cada pareja de cebadores haciendo una curva estándar con diluciones seriadas de cDNA. El valor de la eficiencia (E) se calculó utilizando el valor de pendiente de la curva estándar (m) con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = 1 - 10^{-1/m}$$

El % de eficiencia se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Eficiencia} = (E - 1) \times 100$$

Sólo se utilizaron cebadores con una eficiencia de amplificación cercana al 100 %.

Cada muestra se midió en triplicas en dos experimentos independientes.

Los niveles de expresión relativa de *miR-17-92hg* se calcularon con el método $\Delta\Delta\text{CT}$, utilizando como referencia el gen *Gapdh*. Para ello se

aplicó la siguiente fórmula, donde el término “reference” se refiere a *Gapdh* y “target” al gen objeto de estudio:

$$\Delta CT = 2^{CT_{(\text{reference})} - CT_{(\text{target})}}$$

La estandarización de los valores obtenidos se hizo dividiéndolos entre el menor valor de expresión dentro de las distintas muestras.

3.2.5 Recuento de esperma del epidídimo

- Separar los epidídimos de los testículos y colocarlos en un placa de Petri pequeña que contenga $\sim 500 \mu\text{l}$ de PBS 1 \times . Picarlos con tijeras en varios trozos de 1-2 mm.
- Pasar el contenido a un tubo de 1.5 ml y apretar los trozos de tejido contra las paredes del tubo utilizando un émbolo pequeño y cónico para asegurar que todos los espermatozoides salen del epidídimo.
- Añadir más PBS 1 \times al tubo y trasvasar todo el contenido a un tubo de 15 ml. Rellenar con PBS 1 \times hasta 5 ml.
- Dejar sedimentar los fragmentos de tejido durante 1 minuto. Tomar $100 \mu\text{l}$ de la suspensión celular y pasarlos a otro tubo de 1.5 ml que contenga $200 \mu\text{l}$ de PBS 1 \times . Con esto, habremos obtenido una dilución del contenido total de esperma de los epidídimos equivalente a un volumen de 30 ml.
- Preparar la cámara de Neubauer con un cubreobjetos de 22 mm y poner una pequeña gota de la suspensión celular en el filo de la zona de recuento.
- Poner la cámara en el microscopio de contraste de fases y hacer un recuento del número de espermatozoides en las 4 áreas de recuento (de 1 mm^2) cada una). Como la cámara tiene un espesor de 0.1 mm, el volumen que corresponde a cada área de recuento es de $0.1 \mu\text{l}$.
- Calculamos la media del recuento hecho en en las 4 áreas y, multiplicándola por 300 000, tendremos una estimación del número

3. MATERIAL Y MÉTODOS

total de espermatozoides presentes inicialmente en los epidídimos. El número 300 000 resulta de dividir 30 000 (el número de μl contenidos en 30 ml de suspensión celular) entre 0.1 μl (el volumen correspondiente a cada área de recuento), y por tanto, representa el número de veces que el volumen de recuento está contenido en el volumen total de la dilución.

3.2.6 Análisis de testosterona

Extrajimos la sangre mediante punción cardíaca, justo tras el sacrificio del ratón y procedimos con el siguiente protocolo:

- Dejar coagular la sangre a RT durante 30 minutos.
- Centrifugar 20 minutos a 5 000 rpm y RT
- Recolectar el sobrenadante (suero) y pasar a un criotubo.
- Almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Blood collected from males was incubated at 4°C for overnight to permit coagulation and then centrifuged at 6 000 rpm for 20 min at 4°C . The supernatant (serum) was collected with a pipette and stored at -80°C .

Radioimmunoassay for *in vitro* determination of testosterone in serum was carried out using a commercially available kit (TESTO-CTK kit, from DiaSorin, Saluggia, Italy) following manufacturer's instructions. Briefly, 50 μl of standard, control or samples were added to individual tubes coated with testosterone antiserum raised in rabbit. The concentrations of the standards used were as follows: 0, 12, 38, 160, 540, 1500, 5000 pg/ml. To each tube, 500 μl of tracer (I^{125} -labeled testosterone) was added and mixed well. To obtain total cpm, 500 μl of tracer was added to 2 additional tubes. All the tubes were then incubated for 3 hours at 37°C . All the contents of these tubes were aspirated carefully except the 2 tubes labeled for total cpm. Total radioactivity (B0) and bound radioactivity (B) were measured. The standard curve for the determination of testosterone concentrations in samples were measured at the same time as the standards. Standard

curve was plotted using a semi-logarithmic curve fit with B/B_0 (%) on vertical axis and the testosterone concentration of the standards on the horizontal axis (ng/ml). Results were obtained from the standard curve by interpolation.

The analytical sensitivity of RIA kit was 0.02 ng/mL (0.07 nmol/L) at 95 % confidence limit. Inter-assay coefficient of variation was found to be below or equal to 7.2 % and Intra-assay coefficient of variation was found to be below or equal to 8.1 %.

3.2.7 Administración del Tamoxifeno

Inicialmente, administramos el tamoxifeno (TX) (Sigma; ref. T5648) por vía oral disuelto en aceite de maíz (Sigma; ref. C8267) durante 5 días consecutivos, a una concentración de 30 mg/ml, y 0.16 mg de TX por gramo de peso corporal. Para favorecer la disolución del TX, calentamos la solución a 65 °C durante 5 minutos y la dejamos enfriar. Con este tratamiento, los ratones dobles mutantes *Sox9/8* mostraban una letalidad del 90 %, probablemente por la reducción idiopática de peso que sufren los ratones *Sox8*^{-/-} (Sock *et al.*, 2001), por lo que redujimos la dosis de TX hasta 0.07 mg de TX por gramo de peso corporal. En esta ocasión, el 90 % de los ratones dobles mutantes sobrevivieron, pero la eficiencia de la recombinación de CRE en las células de Sertoli adultas cayó por debajo del 20 %, por lo que cambiamos de estrategia. Así, alimentamos a los ratones con una dieta suplementada con TX (40 mg de TX por cada 100 g de dieta Harlan 2914) durante 30 días. Este tratamiento resultó en una tasa de supervivencia del 100 % y nos permitió inducir fenotipos notables en los ratones mutantes. La administración del TX se inició a los 2 meses de edad (P60) y finalizó 30 días después (P90 [30 datx]), “datx” hace referencia a los días que ha pasado después del inicio del tratamiento. Para mayor aclaración ver la figura 4.1 en la sección de Resultados.

La dieta con TX se prepara del siguiente modo:

- Pesar 200 g de pienso en pellets y triturar con una batidora.
- Añadir 80 mg de Tx y mezclar con el pienso triturado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- Verter la mezcla en una probeta de 1 l y colocarla en un rotor diseñado en nuestro laboratorio.
- Dejar girando durante 24 horas para que el TX se distribuya por todo el pienso.
- La dieta con TX se suministra a los ratones en unos comederos especiales diseñados para este fin.

3.2.8 Tratamiento con WIN 18 446

Inyectamos 50 μ l de WIN 18 446 (Tocris, Biotechnique, UK; ref. 4736) (40 μ g/ μ l disuelto en DMSO) subcutáneamente a los ratones *Sox9-CreERT2;Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}* tratados con TX. Como controles, utilizamos los mismos ratones, tratados con TX, pero en este caso le inyectamos 50 μ l de DMSO. Las inyecciones se aplicaron durante 8 días consecutivos, 4 días antes del final del tratamiento con TX y 4 días después. Los ratones se sacrificaron 15 días después de la última dosis de WIN 18 446, extrajimos las gónadas y las procesamos.

3.2.9 Preparación de soluciones

Fijador SERRA Esta solución se compone de:

- 60% de Etanol 100%.
- 30% de Formaldehído.
- 10% de Ácido acético glacial.

Fijador Paraformaldehído al 4% Para preparar 1 l:

- Calentar \sim 600 ml de H₂O bidestilada a 60 °C.
- Añadir 40 g de Paraformaldehído y remover utilizando un agitador magnético.

- Añadir NaOH 2 M gota a gota. El Paraformaldehído no se disolverá hasta que el pH sea básico.
- Retirar del calentador y agregar 100 ml de PBS 10×.
- Ajustar el pH a 7.2 con HCl 1 N.
- Completar con H₂O bidestilada hasta 1 l.
- Filtrar y alicuotar.
- Almacenar a -20 °C hasta su uso.

PBS 10× Para preparar 500 ml:

- Disolver los siguientes componentes en 400 ml de H₂O bidestilada:
 - NaCl: 40 g
 - KCl: 1 g
 - Na₂HPO₄: 7.2 g
 - KH₂PO₄: 1.2 g
- Añadir H₂O bidestilada hasta 500 ml y autoclavar.
- Ajustar el pH a 7.4 cuando el PBS se utilice a una concentración 1×.

Solución stock de proteinasa K

- Disolver la proteinasa K liofilizada (Sigma; ref. P2308) a una concentración de 20 mg/ml en H₂O ultrapura.
- Alicuotar y guardar a -20 °C.

NaCl 5 M Para preparar 250 ml:

- Disolver 73.125 g en H₂O bidestilada y ajustar volumen a 250 ml.
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

EDTA 0.5 M pH=8 Para un volumen de 100 ml:

- Añadir 18.612 g de EDTA a 80 ml de H₂O bidestilada.
- Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 N
- Ajustar volumen a 100 ml.
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

Tris-HCl 1 M pH=7.5 Para preparar 200 ml:

- Pesar 24.228 g de Tris base y disolverlos en 180 ml de H₂O bidestilada.
- Ajustar el pH a 7.5 con HCl. Puesto que la adición de HCl genera calor, esperar a que la solución se enfríe a temperatura ambiente y volver a ajustar el pH.
- Añadir H₂O bidestilada hasta un volumen de 200 ml.

MgCl₂ 1 M Para preparar 100 ml:

- Disolver 23 g de MgCl₂*6H₂O en 80 ml de H₂O bidestilada y ajustar volumen.

EGTA Para preparar 100 ml:

- Disolver 19 g de EGTA en 80 ml de H₂O bidestilada.
- Ajustar el pH a 8.
- Añadir H₂O bidestilada hasta un volumen de 100 ml.

SDS 10 % Para preparar 10 ml:

- Disolver 1 g de SDS en 10 ml de H₂O bidestilada.

Tampón de carga 6× Para preparar 10 ml:

- 7 ml de H₂O bidestilada.
- 3 ml de glicerol.
- 12.5 mg de azul de bromofenol.

CaCl₂ 0.5 M Para preparar 100 ml:

- Disolver 5.5 g de CaCl₂ en 80 ml de H₂O bidestilada y ajustar volumen.

NaOH 2 N Para preparar 100 ml:

- Disolver 8 g de NaOH en 80 ml de H₂O destilada y ajustar volumen.

Tampón TAE 50× Para preparar un volumen de 1 l

- Añadir los siguientes componentes a 800 ml de H₂O destilada:
- Tris 242 g
- Ácido acético 57.1 ml
- EDTA 0.5 M pH 8 100 ml
- Ajustar con H₂O hasta 1 l.

Tampón fosfato 0.1 M pH=7.3

- Preparar las siguientes soluciones por separado:
- Fosfato Sódico Monobásico 0.1 M (A). Para 500 ml, disolver 6.8 g en 400 ml de H₂O bidestilada y ajustar el volumen.
- Fosfato Sódico Dibásico 0.1 M (B). Para 1 l, disolver 14.1 g en 800 ml de H₂O bidestilada y ajustar el volumen.
- Para preparar 500 ml de Tampón fosfato, añadir 115 ml de A y 385 ml de B.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Deoxicolato sódico 1 % Para preparar 10 ml:

- Disolver 100 mg de Deoxicolato sódico en 10 ml de H₂O bidestilada.

Ferrocianuro de Potasio 100 mM Para preparar 10 ml:

- Disolver 422.4 mg de Ferrocianuro de Potasio en 10 ml de H₂O bidestilada.

Ferricianuro de Potasio 100 mM Para preparar 10 ml:

- Disolver 329.3 mg de Ferricianuro de Potasio en 10 ml de H₂O bidestilada.

X-Gal

- Disolver el X-Gal en polvo (Sigma; ref. B4252) a una concentración de 20 mg/ml en N,N-dimetilformamida o DMSO.
- Alicuotar y guardar a -20 °C.

Sudan Black B 0.1 % Para preparar 10 ml:

- Disolver 10 mg de SBB (Sigma; ref. 199664) en 10 ml de etanol al 70 %.
- Filtrar la solución antes de utilizarla.

DAPI 100×

- Añadir 2 μ l de 4',6-diamino-2-fenilindol (50 000 \times) a 1 ml de PBS 1 \times .
- Mezclar por pipeteo y cubrir con papel de aluminio.

Hematoxilina

- Agregar 2 g de hematoxilina a 20 ml de etanol absoluto.
- Disolver 40 g de alumbre potásico (sulfato de Al y K) en 400 ml de H₂O destilada.
- Después de 24 horas, mezclar las dos soluciones y añadir 1 g de HgO.
- Calentar la solución y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Filtrar y almacenar en botella de vidrio ámbar.

Eosina

- Disolver 4.5 g de eosina en 450 ml de H₂O.
- Agregar 4 gotas de ácido acético glacial y agitar.
- Filtrar y almacenar en botella de vidrio ámbar.

3.2.10 Procesamiento de datos RNA-seq

Los datos brutos de fastq se comprobaron primero con fastQC:

<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Los datos de RNA-seq fueron procesados con las herramientas *Tuxedo* (Trapnell *et al.*, 2012).

El alineamiento se realizó con tophat/bowtie2 frente al genoma UCSC *mm10* de ratón.

Un comando de ejemplo para un procesamiento de muestras de lecturas emparejadas es:

```
1 tophat -p 8
2 -G mm10/Mus_musculus/UCSC/mm10/Anotacion/Genes/genes.gtf
3 ~/transcriptome/tophat-cufflinks/mm10/
4 Mus_musculus/UCSC/mm10/Secuencia/Bowtie2Index/genoma
5 ~/transcriptome/tophat-cufflinks/mouse/A12_1.fastq
6 ~/transcriptome/tophat-cufflinks/mouse/A12_2.fastq > logs/A12.log
```

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los análisis de expresión diferencial se realizaron con *cuffdiff*. Analizamos 3 muestras replicadas para cada una de las condiciones mutantes: *Wt1-CRE* (A12, A34, A56) y *Sox9-CRE* (B12, B34, B56). Para evaluar el efecto del Tamoxifeno (TX) se incluyeron dos controles: machos de tipo salvaje con y sin tratamiento con Tamoxifeno con dos muestras replicadas cada uno: machos con tratamiento TX (C12, C34) y machos sin tratamiento TX (D12, D34). También se incluyeron dos réplicas de tejido ovárico (E1, E2)

Un comando de jemplo para el análisis de expresión diferencial es el siguiente (Nótese que las réplicas de la misma condición están separadas por comas y cada condición está separada por espacio):

```
1 cuffdiff -o diff_out_ALL
2 -b mm10/Mus_musculus/UCSC/mm10/Sequence/Bowtie2Index/genome.fa
3 -p 8
4 -u mm10/Mus_musculus/UCSC/mm10/Annotacion/Genes/genes.gtf
5 tophat_out_A12/accepted_hits.bam ,
6 tophat_out_A34/accepted_hits.bam ,
7 tophat_out_A56/accepted_hits.bam
8 tophat_out_B12/accepted_hits.bam ,
9 tophat_out_B34/accepted_hits.bam ,
10 tophat_out_B56/accepted_hits.bam
11 tophat_out_C12/accepted_hits.bam ,
12 tophat_out_C34/accepted_hits.bam
13 tophat_out_D12/accepted_hits.bam ,
14 tophat_out_D34/accepted_hits.bam
15 tophat_out_E1/accepted_hits.bam ,
16 tophat_out_E2/accepted_hits.bam
```

Instalación de *cummeRbund*

El análisis de los datos resultantes se realizó con el paquete *cummeRbund* de Bioconductor.

La instalación de *cummeRbund* se realizó desde R de la forma recomendada en la documentación del paquete: :

```
1 source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
2 biocLite("cummeRbund")
```

Una vez cargada la librería en el entorno de trabajo:

```
>library(cummeRbund)
```

los datos se leyeron en una instancia del objeto *CuffSet*:

```
1 cuff<-readCufflinks(dir="../diff_out_ALL",
2 genome="mm10",
3 gtfFile="../mm10/Mus_musculus/UCSC/mm10/Annotation/Genes/genes.gtf",
4 rebuild=TRUE,
5 verbose=TRUE)
```

tras lo que se comprueba si la variable `cuff` ha sido correctamente poblada:

```
1 > cuff
2 CuffSet instance with:
3   5 samples
4   23997 genes
5   33295 isoforms
6   27067 TSS
7   26406 CDS
8   239360 promoters
9   270670 splicing
10  204800 reICDS
```

Controles de calidad

Una vez cargados los datos se ejecutaron diferentes controles de calidad como el plot de dispersión, el coeficiente de variación, la comparación de puntuaciones FPKM entre muestras y la divergencia entre réplicas.

Exploración de los datos

Los datos se exploraron mediante análisis de clusterización, gráficos de dispersión y *volcano plots*.

Se muestran a continuación ejemplos de código para los diferentes análisis:

Gráficos de dispersión

```
1 > disp<-dispersionPlot(genes(cuff))
2 > disp
3 > dev.copy2pdf(file='~/git/transcriptome/figures/dispersionplot.pdf',
4               )
```

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Coefficientes de variación Los cuadrados del coeficiente variación permiten la visualización de la variabilidad cruzada entre condiciones y puede ser una métrica útil para determinar la calidad de los datos a nivel de genes:

```
1 > genes.scv<-fpkmSCVPlot(genes(cuff))
2 > genes.scv
3 > dev.copy2pdf(file='/home/mburgos/git/transcriptoma/figures/
  genesscv.pdf')
```

o a nivel de isoformas:

```
1 > isoforms.scv<-fpkmSCVPlot(isoforms(cuff))
2 > isoforms.scv
3 > dev.copy2pdf(file='/home/mburgos/git/transcriptoma/figures/
  isoformsscvcv.pdf')
```

FPKMs entre muestras Estos son ejemplos de código utilizado para analizar FPKMs entre muestras:

```
1 > dens<-csDensity(genes(cuff))
2 > dens
3 > dev.copy2pdf(file='/home/mburgos/git/transcriptoma/figures/
  dens.pdf')
```

y entre réplicas:

```
1 > densrep<-csDensity(genes(cuff),replicates=TRUE)
2 > densrep
3 > dev.copy2pdf(file='/home/mburgos/git/transcriptoma/figures/
  densrep.pdf')
```

Análisis de réplicas Las comparaciones entre réplicas se realizaron mediante *Box plots*:

```
1 pBoxRep<-csBoxplot(genes(cuff),replicates=T)
2 pBoxRep
3 dev.copy2pdf(file='/home/mburgos/git/transcriptoma/figures/
  replicates.pdf')
```

Análisis de datos

Los datos se analizaron mediante análisis de clúster:

```
1 > pDendro<-csDendro(genes(cuff),replicates=T)
```

y las realaciones entre diferentes condiciones mediante *Box plots*

```
1 > pBox<-csBoxplot(genes(cuff))
```

Se realizaron también plots de dispersión comparando todas las muestras por parejas:

```
1 > scatter<-csScatterMatrix(genes(cuff))
```

Las significación estadística de los datos fue explorada mediante plots de volcán:

```
1 > volcano<-csVolcanoMatrix(genes(cuff))
```

Análisis de características significativas

Se analizaron también por diversos métodos distintas características como:

Los genes que mostraban expresión diferencial entre clases:

```
1 > mySigMatGenes<-sigMatrix(cuff,level="genes",alpha=0.05)
```

Las isoformas que mostraban expresión diferencial:

```
1 > mySigMatIsoforms<-sigMatrix(cuff,level="isoforms",alpha=0.05)
```

Alternativas de inicio de la transcripción (TSS):

```
1 > mySigMatTSS<-sigMatrix(cuff,level="TSS",alpha=0.05)
```

Expresión diferencial de secuencias codificantes (CDS):

```
1 > mySigMatCDS<-sigMatrix(cuff,level="CDS",alpha=0.05)
```

Se realizaron también *Heatmaps* de distancias entre condiciones:

```
1 > myDistHeat<-csDistHeat(genes(cuff))
```

Usando tanto datos de genes, como de isoformas, TSS y CDS.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis de genes, isoformas, TSS y CDS

La extracción de genes, isoformas, TSS y CDS que mostraban expresión diferencial entre condiciones se realizó inicialmente a un nivel de 0.05:

```
1 > mySigIsoformsIds<-getSig(cuff,alpha=0.05,level="isoforms")
2 > mySigTSSIds<-getSig(cuff,alpha=0.05,level="TSS")
3 > mySigCDSIds<-getSig(cuff,alpha=0.05,level="CDS")
4 > length(mySigGeneIds)
5 [1] 14697
6 > length(mySigIsoformsIds)
7 [1] 14648
8 > length(mySigTSSIds)
9 [1] 14768
10 > length(mySigCDSIds)
11 [1] 13837
```

Se realizaron también análisis comparativos de condiciones por parejas. Como ejemplo se muestran los comandos utilizados para la comparación de los dos tipos de mutantes, así como para comprobar el número de genes que mostraban expresión diferencial:

```
1 > length(Wt1_CRE_vs_Sox9_CRE.sigGenesIds)
2 [1] 1185
3 > Wt1_CRE_vs_Sox9_CRE.sigIsoformsIds<-getSig(cuff,x="Wt1_CRE",y="
  Sox9_CRE",alpha=0.05,level="isoforms")
4 > length(Wt1_CRE_vs_Sox9_CRE.sigIsoformsIds)
5 [1] 951
6 > Wt1_CRE_vs_Sox9_CRE.sigTSSIds<-getSig(cuff,x="Wt1_CRE",y="Sox9_CRE
  ",alpha=0.05,level="TSS")
7 > length(Wt1_CRE_vs_Sox9_CRE.sigTSSIds)
8 [1] 1102
9 > Wt1_CRE_vs_Sox9_CRE.sigCDSIds<-getSig(cuff,x="Wt1_CRE",y="Sox9_CRE
  ",alpha=0.05,level="CDS")
10 > length(Wt1_CRE_vs_Sox9_CRE.sigCDSIds)
11 [1] 946
```

Para la construcción de un *heatmap* de expresión que incluía todas las condiciones el nivel de significación utilizado fue de 0.005, de acuerdo con la corrección de Bonferroni, ya que entre las 5 condiciones comparadas se pueden hacer 10 comparaciones:

```
1 > sigGeneIdsCorr<-getSig(cuff,alpha=0.005,level="genes")
2 > sigGenesCorr<-getGenes(cuff,sigGeneIdsCorr)
3 > heatCorr<-csHeatmap(sigGenesCorr,cluster="both")
4 > heatCorr
```

3.2. MÉTODOS

```
1 > sigGeneIdsCorr<-getSig(cuff,alpha=0.005,level="genes")
2 > sigGenesCorr<-getGenes(cuff,sigGeneIdsCorr)
3 > sigGenesCorr
4 CuffGeneSet instance for 12380 genes
5
6 Slots:
7   annotation
8   fpkm
9   repFpkm
10  diff
11  count
12 isoforms CuffFeatureSet instance of size 18251
13 TSS      CuffFeatureSet instance of size 14240
14 CDS      CuffFeatureSet instance of size 15588
15 promoters CuffFeatureSet instance of size 12380
16 splicing CuffFeatureSet instance of size 14240
17 relCDS   CuffFeatureSet instance of size 12380
```

Para la construcción del *Heatmap* con expresiones relativas a la expresión en testículo se utilizó el siguiente protocolo:

```
1 > cuff<-readCufflinks(dir="../diff_out_ALL/", genome="mm10", gtfFile
  = "../mm10/Mus_musculus/UCSC/mm10/Annotation/Genes/genes.gtf",
  verbose=TRUE)
2 > sigGenes <- getSig(cuff, alpha=0.005,level='genes')
3 > db <- repFpkmMatrix(genes(cuff))
4 #use db <- fpkmMatrix(genes(cuff)) if no replicates
5 > db <- db[sigGenes,]
6 > WT<-"Control_0" #WT<-"Control" if no replicates
7 > mut<-c("Control_0","Control_1","Control_TMX_0","Control_TMX_1",
  Wt1_CRE_0","Wt1_CRE_1","Wt1_CRE_2","Sox9_CRE_0","Sox9_CRE_1",
  Sox9_CRE_2","female_0","female_1")
8 #mut<-c("Control","Control_TMX","Wt1_CRE","Sox9_CRE","female") if no
  replicates
9 > dblog <- logFC(db,mutants=mut,WT=WT,logBase=2,pseudo=1)
10 > dblog <- as.matrix(dblog)
11 > heatmap.2(dblog,Rowv=TRUE,Colv=FALSE,dendrogram="none",trace="none",
  ,labRow="",density.info=c("none"),main="Log(Fold-Change)",col=
  hmcpls)
12 > dev.copy2pdf(file='~/home/mburgos/git/transcriptoma/figures/
  heatLogFCReplicates.pdf')
13 > png(filename="~/git/transcriptoma/figures/heatLogFCReplicates.png",
  ,width=2000,height=10000)
14 > heatmap.2(dblog,Rowv=TRUE,Colv=FALSE,dendrogram="none",trace="none",
  ,labRow="",density.info=c("none"),main="Log(Fold-Change)",col=
  hmcpls)
15 > dev.off()
```

Las líneas comentadas que comienzan por # son las que se utilizaron

3. MATERIAL Y MÉTODOS

en sustitución de la anterior para representar las muestras individualmente en lugar de agrupadas por condiciones.

La función `logFC` para calcular el logaritmo neperiano del cambio de expresión es la siguiente:

```
1 logFC <- function(db,mutants,WT,logBase=2,pseudo=1) {
2   if (length(WT) !=1 ) {
3     stop('WT must refer to a single gene/column')
4   }
5   if (is.numeric(logBase)==FALSE) {
6     stop('logBase must be a numeric value')
7   }
8
9   db <- (db[,mutants]+pseudo)/(db[,WT]+pseudo)
10  db <- log(db,logBase)
11
12 }
```

Análisis de marcadores

Para el análisis de genes marcadores de diferentes tipos celulares se importaron las listas de genes de interés desde un archivo a una variable de R. Como ejemplo, para el caso de marcadores de células de Sertoli, la lista de genes y el procedimiento fueron los siguientes:

```
1 cat sertoli.genes.list
2 Shbg Amh Calb2 Cts1 Krt18 Clu Dhh Des Fas Fas1 Gata1 Gata4 Inhbb
   Kit1 Papln Trf Vim Wt1 Cldn11 Htra1
```

Leer el archivo a una variable de R:

```
1 > sertoli<-scan("sertoli.genes.list",what="")
2 > sertoli
3 [1] "Shbg" "Amh" "Calb2" "Cts1" "Krt18" "Clu" "Dhh"
   "Des"
4 [9] "Fas" "Fas1" "Gata1" "Gata4" "Inhbb" "Kit1" "Papln"
   "Trf"
5 [17] "Vim" "Wt1" "Cldn11" "Htra1"
```

Conectar con la base de datos, obtener los datos y realizar el *Heatmap*:

```
1 > cuff<-readCufflinks(dir="../diff_out_ALL", genome="mm10", gtfFile=
   "../mm10/Mus_musculus/UCSC/mm10/Annotation/Genes/genes.gtf",
   verbose=TRUE)
```

```

2 > sertoliGenes<-getGenes(cuff,sertoli)
3 > sertoliHeat<-csHeatmap(sertoliGenes,cluster='both')
4 > sertoliHeat
5 > png(filename=~/.git/transcriptoma/figures/sertoliHeat.png", width
      =4000, height=4000)
6 > sertoliHeat
7 > dev.off()

```

Crear un *Heatmap* de expresión relativa utilizando la expresión en testículo como estándar:

```

1 > library(gplots)
2 > dbSertoli <- fpkmMatrix(sertoliGenes)
3 > WT<-"Control"
4 > mut<-c("Control","Control_TMX","Wt1_CRE","Sox9_CRE","female")
5 > dbSertoliLog <- logFC(dbSertoli,mutants=mut,WT=WT,logBase=2,pseudo
      =1)
6 > dbSertoliLog <- as.matrix(dbSertoliLog)
7 > hmcols <- rev(redgreen(2750))
8 > heatmap.2(dbSertoliLog,Rowv=TRUE,Colv=FALSE,dendrogram="none",
      trace="none",density.info=c("none"),main="Log(Fold-Change)",col=
      hmcols)
9 > png(filename=~/.git/transcriptoma/figures/sertoliLogFCHeat.png",
      width=5300, height=6400)
10 > heatmap.2(dbSertoliLog,Rowv=TRUE,Colv=FALSE,dendrogram="none",
      trace="none",density.info=c("none"),main="Log(Fold-Change)",col=
      hmcols)
11 > dev.off()

```

Análisis de genes específicos de ovario sobre-expresados en mutantes

Para realizar éste análisis se obtuvieron en primer lugar los genes que mostraban expresión diferencial a un nivel de significación de 0.005. A continuación se construyó una matriz con los FPKMs de los genes con expresión diferencial significativa y se calculó el logaritmo natural de su expresión respecto a la expresión en testículo. Posteriormente se extrajeron los genes que mostraban unos mayores niveles de expresión en ovario. De entre estos genes, se obtuvieron aquéllos que también aumentaron significativamente su expresión respecto al testículo en ambos tipos de mutantes por separado y en conjunto. El procedimiento seguido y la construcción de los *Heatmaps* correspondientes fue la siguiente:

3. MATERIAL Y MÉTODOS

```
1 #get significant
2 sigGeneIdsCorr<-getSig(cuff,alpha=0.005,level="genes")
3 sigGenesCorr<-getGenes(cuff,sigGeneIdsCorr)
4 #get FPKM matrix of significant genes
5 dbSigGenesCorr<-fpkmMatrix(sigGenesCorr)
6 #calculate Log fold change respect to male Control
7 dbSigGenesCorrLogFC<-logFC(dbSigGenesCorr,mutants=mut,WT=WT,logBase
  =2,pseudo=1)
8 #extract female specific genes -> logFC > 0
9 > overFemale=dbSigGenesCorrLogFC[dbSigGenesCorrLogFC[,"female"] >
  0,]
10 > nrow(overFemale)
11 [1] 5758
12 #extract female specific genes that are also overexpressed in Sox9-
  CRE
13 > overFemale_Sox9=overFemale[overFemale[,"Sox9_CRE"] > 0,]
14 > nrow(overFemale_Sox9)
15 [1] 5124
16 #extract female specific genes that are also overexpressed in Wt1-
  CRE
17 > overFemale_Wt1=overFemale[overFemale[,"Wt1_CRE"] > 0,]
18 > nrow(overFemale_Wt1)
19 [1] 5118
20 #extract female specific genes overexpressed in both mutants
21 > overFemale_Sox9_Wt1=overFemale[overFemale[,"Wt1_CRE"] > 0,]
22 > nrow(overFemale_Sox9_Wt1)
23 [1] 5118
24 #make heatmap
25 > overFemale_Sox9_Wt1<-as.matrix(overFemale_Sox9_Wt1)
26 > heatmap.2(overFemale_Sox9_Wt1,Rowv=TRUE,Colv=FALSE,dendrogram="
  none",labRow="",trace="none",density.info=c("none"),main="Log(
  Fold-Change)",col=hmcols)
27 #copy to pdf
28 > dev.copy2pdf(file='/home/mburgos/git/transcriptoma/figures/
  overFemale_Sox9_Wt1.pdf')
29 #write to png
30 > png(filename=~"/git/transcriptoma/figures/overFemale_Sox9_Wt1.png"
  ,width=1000,height=5000)
31 > heatmap.2(overFemale_Sox9_Wt1,Rowv=TRUE,Colv=FALSE,dendrogram="
  none",labRow="",trace="none",density.info=c("none"),main="Log(
  Fold-Change)",col=hmcols)
32 > dev.off()
```

Efecto del tratamiento con Tamoxifeno

La comparación de testículos controles con y sin TX permite verificar el efecto que este tratamiento pudiera tener en la expresión de genes en

testículo, que podrían enmascarar o alterar los efectos del silenciamiento de *Sox9*.

Como podemos ver a continuación:

```
1 > controlGeneIds<-getSig(cuff,"Control","Control_TMX",alpha=0.05,
   level="genes")
2 > controlGeneIds
3 character(0)
```

no existe ningún gen que muestre expresión diferencial en testículo dos meses después de finalizar el tratamiento a un nivel de significación de 0.05 ya que tras extraer la lista de genes con expresión diferencial entre ambos controles, la variable donde se almacenaron no contenía ningún gen que cumpliera con las condiciones.

3.2.11 Procesamiento de datos del microarray

En este trabajo se han realizado comparaciones de datos procedentes de RNA-seq con datos procedentes de *microarrays*. El tratamiento de estos datos se ha realizado según el procedimiento que se describe a continuación.

- Mover o enlazar los archivos CEL en el directorio donde se va a ejecutar R.
- \$ Crear un archivo con el listado de los archivos CEL: `ls ../cel/*.CEL >data/phenodata.txt`
- Modificar el archivo para que tenga la siguiente estructura, delimitado por tabuladores:

```
1 Name  Filename  Target
2 Cont-1.GSM673862.CEL  Cont-1.GSM673862.CEL  Cont
3 Cont-2.GSM673862.CEL  Cont-2.GSM673862.CEL  Cont
4 Dhh-1.GSM673862.CEL  Dhh-1.GSM673862.CEL  Mut
5 Dhh-2.GSM673862.CEL  Dhh-2.GSM673862.CEL  Mut
6 Sf1-1.GSM673862.CEL  Sf1-1.GSM673862.CEL  Mut
7 Sf1-2.GSM673862.CEL  Sf1-2.GSM673862.CEL  Mut
8 Sf1-3.GSM673862.CEL  Sf1-3.GSM673862.CEL  Mut
9 Sf1-4.GSM673862.CEL  Sf1-4.GSM673862.CEL  Mut
```

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La última columna agrupa las condiciones. Se agruparon todos los mutantes para compararlos juntos con nuestro transcriptoma.

- Cargar la librería *simpleaffy* en R y leer el archivo

```
1 > library(simpleaffy)
2 > celfiles <- read.affy(covdesc="phenodata.txt")
3 > celfiles
4 AffyBatch object
5 size of arrays=1002x1002 features (20 kb)
6 cdf=Mouse430_2 (45101 affyids)
7 number of samples=8
8 number of genes=45101
9 annotation=mouse4302
10 notes=
```

La librería que habrá que cargar más adelante para anotar los símbolos de los genes será por tanto *mouse4302.db*.

- Normalizar los datos por el método CG-RMA:

```
1 > celfiles.gcrma <- gcrma(celfiles)
2 Adjusting for optical effect.....Done.
3 Computing affinitiesLoading required package: AnnotationDbi
4 .Done.
5 Adjusting for non-specific binding.....Done.
6 Normalizing
7 Calculating Expression
8 > celfiles.gcrma
9 ExpressionSet (storageMode: lockedEnvironment)
10 assayData: 45101 features, 8 samples
11  element names: exprs
12 protocolData
13  sampleNames: Cont-1.GSM673862.CEL Cont-2.GSM673862.CEL ...
14    Sf1-4.GSM673862.CEL (8 total)
15  varLabels: ScanDate
16  varMetadata: labelDescription
17 phenoData
18  sampleNames: Cont-1.GSM673862.CEL Cont-2.GSM673862.CEL ...
19    Sf1-4.GSM673862.CEL (8 total)
20  varLabels: sample Filename Target
21  varMetadata: labelDescription
22 featureData: none
23 experimentData: use 'experimentData(object)'  
24 Annotation: mouse4302
```

- Eliminar los datos no informativos, como controles y genes con poca variación o expresión próxima al *background*.

```

1 > celfiles.filtered <-
2     nsFilter(celfiles.gcrma, require.entrez=FALSE,
3             remove.dupEntrez=FALSE)
4 > celfiles.filtered$filter.log
5 $numLowVar
6 [1] 22519
7 $feature.exclude
8 [1] 64

```

- Buscar genes expresados diferencialmente y preparar el diseño experimental

```

1 > samples <- celfiles.gcrma$Target
2 > # check the results of this
3 > samples
4 [1] "Cont" "Cont" "Mut" "Mut" "Mut" "Mut" "Mut" "Mut"
5 > # convert into factors
6 > samples <- as.factor(samples)
7 > # check factors have been assigned
8 > samples
9 [1] Cont Cont Mut Mut Mut Mut Mut Mut
10 Levels: Cont Mut
11 > # set up the experimental design
12 > design <- model.matrix(~0 + samples)
13 > colnames(design) <- c("Cont","Mut")
14 > # inspect the experiment design
15 > design
16   Cont Mut
17 1     1  0
18 2     1  0
19 3     0  1
20 4     0  1
21 5     0  1
22 6     0  1
23 7     0  1
24 8     0  1
25 attr(,"assign")
26 [1] 1 1
27 attr(,"contrasts")
28 attr(,"contrasts")$samples
29 [1] "contr.treatment"

```

- Analizar el modelo con *limma*

```

1 > library(limma)
2 > # fit the linear model to the filtered expression set
3 > fit <- lmFit(exprs(celfiles.filtered$eset), design)
4 > # set up a contrast matrix to compare tissues v cell line

```

3. MATERIAL Y MÉTODOS

```
5 > contrast.matrix <- makeContrasts(Mut_Cont = Mut - Cont,
  levels=design)
6 > # check the contrast matrix
7 > contrast.matrix
8       Contrasts
9 Levels Cont_Mut
10  Cont      -1
11  Mut       1
12 > # Now the contrast matrix is combined with the per-probeset
  linear model fit.
13 > dmrt1_fits <- contrasts.fit(fit, contrast.matrix)
14 > dmrt1_ebFit <- eBayes(dmrt1_fits)
15 > # return the top 10 results for any given contrast
16 > # coef=1 is Mut_Cont
17 > topTable(dmrt1_ebFit, number=10, coef=1)
18           logFC AveExpr      t      P.Value
           adj.P.Val      B
19 1418956_at    -9.579860 4.681060 -63.36072 5.937146e-12 6
   .138868e-08 15.26364
20 1452964_at    -7.824264 4.171063 -54.16272 2.037480e-11 6
   .138868e-08 14.77490
21 1430102_at    -9.008269 4.466457 -53.79659 2.149032e-11 6
   .138868e-08 14.75150
22 1458481_at   -10.407799 4.823976 -53.56755 2.222308e-11 6
   .138868e-08 14.73669
23 1449554_at    -9.461663 5.080788 -52.09215 2.767672e-11 6
   .138868e-08 14.63782
24 1419337_at    -9.802278 4.670395 -51.32203 3.111263e-11 6
   .138868e-08 14.58374
25 1431382_a_at  -8.340512 4.291732 -50.96755 3.285374e-11 6
   .138868e-08 14.55826
26 1450801_at    -8.430387 4.306204 -50.74739 3.399032e-11 6
   .138868e-08 14.54224
27 1432536_at    -9.715187 4.800828 -50.61209 3.471071e-11 6
   .138868e-08 14.53232
28 1453893_at    -7.435160 4.034871 -50.33733 3.622726e-11 6
   .138868e-08 14.51199
```

- Anotar con los símbolos de los genes

```
1 >#Obtener la lista completa de sondas
2 probeset.list <- topTable(dmrt1_ebFit, coef=1, number=1000000)
3 > library(mouse4302.db)
4 > library(annotate)
5 > gene.symbols <- getSYMBOL(row.names(probeset.list), "
  mouse4302.db")
6 > results <- cbind(probeset.list, gene.symbols)
7 > head(results)
8           logFC AveExpr      t      P.Value
           adj.P.Val      B
```

```

 9 1418956_at  9.493704 4.681060 56.41301 8.329531e-11 7.365425e
    -07 13.39515
10 1458481_at 10.225503 4.823976 49.90372 2.012014e-10 7.365425e
    -07 13.01372
11 1452964_at  7.741580 4.171063 48.67035 2.408697e-10 7.365425e
    -07 12.92870
12 1419337_at  9.624381 4.670395 47.78677 2.747829e-10 7.365425e
    -07 12.86489
13 1430102_at  9.067142 4.466457 46.23626 3.483117e-10 7.365425e
    -07 12.74664
14 1442031_at  9.232470 4.905697 45.99949 3.614054e-10 7.365425e
    -07 12.72784
15                                gene.symbols
16 1418956_at                      Tssk6
17 1458481_at                      Gm614
18 1452964_at                      Ttl111
19 1419337_at 1700080E11Rik
20 1430102_at                      Rnf148
21 1442031_at                      Mcu

```

- Guardar los datos en un archivo

```

1 > write.table(results, "results-todos.txt", sep="\t", quote=
  FALSE)

```

Modificación de los datos del *microarray* para poderlos agrupar con los de RNA-seq

- Editar results.txt (se utilizó el editor **vim**)
- Buscar en la columna Adj. P Value el valor mayor por debajo de 0.05 y borrar las líneas siguientes para dejar sólo los genes significativos.
- Los datos necesarios para el análisis son:
 - LogFC: columna 2
 - Símbolo del gen: última columna

El procesamiento de los datos en el editor y la creación de un archivo con la lista de símbolos de los genes para su selección en los datos de RNA-seq se realizó ejecutando las siguientes expresiones regulares:

- Ver los caracteres especiales: `:set list`

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- Eliminar la primera columna: `:%s/^\p{-}\t//`
- Eliminar las columnas intermedias: `:%s/\t.\+\t\t/`
- Intercambiar las columnas: `:%s/(\p{+})\t(\p{+})/\2\t1/`
- Eliminar los genes no identificados: `:%g/^NA/d`
- Entrecomillar los símbolos: `:%s/(\p{-})\t/"\1"\t/`
- Borrar la primera línea con los nombres de las columnas
- Guardar el archivo: `:w test.dmr1`
- Obtener la lista de símbolos: `:%s/\t\p{+}//`
- Quitar las comillas: `:%s/"//g`
- Guardar la lista de símbolos: `:w test.dmr1.genes.list`

Obtención de los FPKMs de la lista de genes en el transcriptoma

```
1 > library(cummeRbund)
2 > listfile="test.dmr1.genes.list"
3 > listfile
4 [1] "test.dmr1.genes.list"
5 >#conectar base de datos de resultados del transcriptoma
6 > cuff<-readCufflinks(dir="../diff_out_ALL/", verbose=TRUE)
7 > cuff
8 CuffSet instance with:
9   5 samples
10  23997 genes
11  33295 isoforms
12  27067 TSS
13  26406 CDS
14  239360 promoters
15  270670 splicing
16  204800 relCDS
17 >#Cargar la lista de genes
18 > genesList <-scan(listfile,what="")
19 Read 3142 items
20 >#De entre estos genes conseguir los que tienen
21 >#expresion diferencial significativa en el transcripoma
22 > sigGenesIds <- getSig(cuff,genesList)
23 >#conseguir los datos de estos genes
24 > genesData <- getGenes(cuff,sigGenesIds)
25 Getting gene information:
```


3.2. MÉTODOS

```
26 FPKM
27 Differential Expression Data
28 Annotation Data
29 Replicate FPKMs
30 Counts
31 Getting isoforms information:
32 FPKM
33 Differential Expression Data
34 Annotation Data
35 Replicate FPKMs
36 Counts
37 Getting CDS information:
38 FPKM
39 Differential Expression Data
40 Annotation Data
41 Replicate FPKMs
42 Counts
43 Getting TSS information:
44 FPKM
45 Differential Expression Data
46 Annotation Data
47 Replicate FPKMs
48 Counts
49 Getting promoter information:
50 distData
51 Getting splicing information:
52 distData
53 Getting relCDS information:
54 distData
55 >Conseguir los FPKMs de todos los genes
56 > dbData <- repFpkmMatrix(genesData)
57 Using tracking_id, rep_name as id variables
58 > head(dbData)
59           Control_0 Control_1 Control_TMX_0 Control_TMX_1
              female_0
60 1110008P14Rik 31.623800 23.135400    26.529000    21.799800 201
              .67400
61 1110012L19Rik  1.069670  1.028100     1.913700     1.199550  30
              .51210
62 1110017D15Rik 487.312000 407.212000    434.166000    462.004000  78
              .27540
63 1110020A21Rik 100.206000  70.520500     72.522600     76.869700   1
              .55833
64 1110034G24Rik  0.541007  0.590960     0.989441     0.968139  27
              .10770
65 1500015010Rik  0.000000  0.190037     0.132447     0.124488  51
              .04300
66           female_1 Sox9_CRE_0 Sox9_CRE_1 Sox9_CRE_2 Wt1_CRE_0
67 1110008P14Rik 260.520000 968.886000 1933.280000 621.828000 636.86400
68 1110012L19Rik  26.451700  14.604500    26.788600    14.143600    15.25980
69 1110017D15Rik 109.009000 47.976300    1.013300    26.595700    6.88374
70 1110020A21Rik  0.967176 12.686200    0.606808    6.447350    1.40754
```

3. MATERIAL Y MÉTODOS

```
71 1110034G24Rik 21.335300 12.870900 18.011300 7.947030 9.65524
72 1500015010Rik 39.637700 0.693472 6.666870 0.402494 1.52814
73           Wt1_CRE_1 Wt1_CRE_2
74 1110008P14Rik 1982.080000 1043.60000
75 1110012L19Rik 24.091700 15.33060
76 1110017D15Rik 1.065870 0.69364
77 1110020A21Rik 0.559434 1.25039
78 1110034G24Rik 16.425900 6.59642
79 1500015010Rik 6.108220 1.40716
```

Cálculo de los LogFC respecto al Control_0

```
1 >#definir variables
2 > WT<-"Control_0"
3 > mut<-c("Control_0","Control_1","Wt1_CRE_0","Wt1_CRE_1","Wt1_CRE_2"
4           ,"Sox9_CRE_0","Sox9_CRE_1","Sox9_CRE_2","female_0","female_
5           1")
6 >#cargar la funcion
7 > source("logFC.R")
8 > dbDataLog <- logFC(dbData,mutants=mut,WT=WT,logBase=2,pseudo=1)
9 > head(dbDataLog)
10           Control_0 Control_1 Wt1_CRE_0 Wt1_CRE_1 Wt1_CRE_2
11           Sox9_CRE_0
12 1110008P14Rik      0 -0.43477410  4.289252  5.925674  5.000882  4
13     .8938184
14 1110012L19Rik      0 -0.02927197  2.973837  3.599738  2.980105  2
15     .9144895
16 1110017D15Rik      0 -0.25848464 -5.952779 -7.884910 -8.171532 -3
17     .3176475
18 1110020A21Rik      0 -0.50086610 -5.393591 -6.020129 -5.490976 -2
19     .8865010
20 1110034G24Rik      0  0.04602415  2.789618  3.499288  2.301446  3
21     .1701161
22 1500015010Rik      0  0.25100643  1.338076  2.829488  1.267332  0
23     .7599841
24           Sox9_CRE_1 Sox9_CRE_2 female_0 female_1
25 1110008P14Rik      5.889728  4.2548371  2.635164  3.002925
26 1110012L19Rik      3.747020  2.8712355  3.928433  3.729423
27 1110017D15Rik     -7.922097 -4.1452878 -2.622858 -2.150182
28 1110020A21Rik    -5.976953 -3.7644239 -5.305949 -5.685025
29 1110034G24Rik      3.624912  2.5375354  4.189020  3.857380
30 1500015010Rik      2.938638  0.4879946  5.701632  5.344747
31 >#Crear una variable con las medias de todos los mutantes
32 > test<-(rowMeans(dbDataLog[,3-8]))
33 > head(test)
34 1110008P14Rik 1110012L19Rik 1110017D15Rik 1110020A21Rik 1110034
35     G24Rik
```

```

27      3.384069      2.637212      -3.806027      -3.948160      2
      .634877
28 1500015010Rik
29      2.183507
30 >#Convertir en matriz
31 > test<-as.matrix(test)
32 > head(test)
33      [,1]
34 1110008P14Rik  3.384069
35 1110012L19Rik  2.637212
36 1110017D15Rik -3.806027
37 1110020A21Rik -3.948160
38 1110034G24Rik  2.634877
39 1500015010Rik  2.183507
40 >#Guardar el archivo
41 > write.table(test,"test")

```

Unión de los datos de microarray y transcriptoma

- Editar el archivo *test* y borrar la primera línea con los nombres de columnas

```

1 > test2<-read.table("test")
2 > head(test2)
3      V1      V2
4 1 1110008P14Rik  3.384069
5 2 1110012L19Rik  2.637212
6 3 1110017D15Rik -3.806027
7 4 1110020A21Rik -3.948160
8 5 1110034G24Rik  2.634877
9 6 1500015010Rik  2.183507
10 > test.dmr1<-read.table("test.dmr1")
11 >#agregar los datos calculando la media de las sondas
12 >#que reconocen el mismo gen
13 > test.dmr12<-aggregate( x= test.dmr1$V2, by = list(test.dmr1$V1)
      , FUN=mean)
14 >#renombrar las columnas de la tabla agregada
15 > head(test.dmr12)
16      Group.1      x
17 1 0610007P14Rik  1.6155353
18 2 0610009B22Rik -1.1757987
19 3 0610009L18Rik -2.4492672
20 4 0610010F05Rik -0.7837358
21 5 0610011F06Rik  1.9733208
22 6 0610012G03Rik  0.4079317
23 > names(test.dmr12)[names(test.dmr12)=="Group.1"] <- "V1"
24 > names(test.dmr12)[names(test.dmr12)=="x"] <- "V2"

```

3. MATERIAL Y MÉTODOS

```
25 > head(test.dmr12)
26           V1          V2
27 1 0610007P14Rik  1.6155353
28 2 0610009B22Rik -1.1757987
29 3 0610009L18Rik -2.4492672
30 4 0610010F05Rik -0.7837358
31 5 0610011F06Rik  1.9733208
32 6 0610012G03Rik  0.4079317
33 >#unir las dos tablas
34 > m=merge(test2,test.dmr12,by="V1")
35 > head(m)
36           V1          V2.x          V2.y
37 1 1110008P14Rik  3.384069 -4.416747
38 2 1110012L19Rik  2.637212 -5.052220
39 3 1110017D15Rik -3.806027  6.822901
40 4 1110020A21Rik -3.948160  8.092341
41 5 1110034G24Rik  2.634877 -4.951099
42 6 1110034G24Rik  2.634877 -4.708031
43 > plot(m[,2],m[,3])
```

Construcción del *plot*

```
1 >#cambiar los circulos por puntos
2 > plot(m[,2],m[,3],pch=".")
3 >#cambiar el color
4 > plot(m[,2],m[,3],pch=".",col=28)
5 >#calcular la recta de regresion (de y sobre x)
6 > reg1 <- lm(m[,3]~m[,2])
7 > reg1
8
9 Call:
10 lm(formula = m[, 3] ~ m[, 2])
11
12 Coefficients:
13 (Intercept)          m[, 2]
14    0.7112          1.0883
15 #añadir ejes que pasan por (0,0) en verde
16 abline(v=0,col="green")
17 abline(h=0,col="green")
18 #añadir recta de regresion en rojo
19 abline(reg1,col="red")
```

Rotular listas de genes ligados al X:

- Conseguir la lista de genes en biomart:

<http://www.ensembl.org/biomart/martview/276fcfee103070438f59ff5eae406a79>

Con los siguientes parámetros:

- Dataset⇒ Mus musculus genes (GRCm38.p4)
- Filters⇒ Chromosome: X
- Attributes⇒ MGI symbol

- guardar el archivo de texto

- Procesado en R:

```

1 > xlinked<-read.table("xlinked.txt")
2 > head(xlinked)
3     V1
4 1  Gm14760
5 2   Gm4992
6 3   Gm6952
7 4  Tgif2lx2
8 5  AA414768
9 6   Gm15103
10 >#seleccionar los datos de los genes que estan en la lista
11 > m.xlinked<-m[m$V1 %in% xlinked$V1,]
12 >#poner triangulos en color rojo
13 > points(m.xlinked$V2.x,m.xlinked$V2.y,pch=24,col="red")
14 >#rotular los genes en color rojo
15 > text(m.xlinked$V2.x,m.xlinked$V2.y,col="red",pos=3,labels=
    xlinked$V1)

```

3.2.12 Asignación de genes a tipos celulares: *Circos plot*

Las lecturas RNA-seq de ratones SC-miR-17-92 KO y sus controles fueron mapeadas frente al genoma de ratón UCSC mm10 usando el alineador STAR RNA-seq (versión 2.5) (Dobin *et al.*, 2013), y posteriormente fueron contadas con la función *featureCounts* del paquete subread de R (Liao *et al.*, 2014). Sólo los genes con 5 o más RPKM (lecturas por kilobase por millón) en al menos dos de las muestras se consideraron expresados y se utilizaron para análisis posteriores. El análisis de la expresión génica diferencial se realizó con edgeR (Robinson *et al.*, 2010).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis de ontología de los genes con expresión diferencial (FDR $<0,01$) se utilizó la base de datos: *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (Dennis *et al.*, 2003). Todos los genes expresados se utilizaron como fondo.

Para generar el *Circos plot*, los datos sin procesar de los transcriptomas previamente publicados por Soumillon *et al.* (2013) fueron descargados del Gene Expression Omnibus (Acc. GSE43717) y procesados con el mismo *pipeline* que nuestros propios datos. Realizamos comparaciones por pares de los transcriptomas de los diferentes tipos de células con el paquete edgeR (Robinson *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2012) de *bioconductor* y utilizamos la función *glmQLFTest()* para realizar las pruebas estadísticas. Posteriormente construimos listas de genes para cada tipo celular. Los genes más expresados en un tipo celular concreto que en cualquiera de los otros tipos fueron incluidos en la lista de este tipo celular en particular. Después de distribuir los genes entre los diferentes tipos de células, calculamos la intersección de cada gen con los genes expresados diferencialmente en testículos SC-*miR-17-92* KO. En el Apéndice A.1 (Página 197) se incluye el código fuente del script que se desarrolló con este fin. A continuación construimos tablas para usarlas como datos de entrada para la biblioteca biocircos.js (Cui *et al.*, 2016). Las tablas incluyen la distribución de todos los genes expresados diferencialmente en nuestro experimento SC-*miR-17-92* KO entre los diferentes tipos de células, sus niveles de expresión relativos en \log_2FC y los sitios diana predichos para las cuatro familias de semillas de *miR-17-92* obtenidos de TargetScan (versión 7.1, <http://www.targetscan.org>) (ver script en el apéndice A.2, página 200). Las tablas se exportaron desde R en formato json y se incluyeron en scripts javascript que usaban las clases de biocircos para dibujar la trama del circo (ver ejemplo en el apéndice A.2)

Los conjuntos de datos transcriptómicos generados durante el presente estudio están disponibles en el repositorio de Arrayexpress **E-MTAB-5914**. Todos los datos bioinformáticos generados y analizados durante este estudio se incluyen en Hurtado *et al.* (2018) y sus archivos de información complementaria.

4. Resultados

4.1 Papel de *Sox9/8* en el testículo adulto

4.1.1 *Sox9* y *Sox8* mantienen la función e integridad de los túbulos seminíferos adultos

Para estudiar el papel de *Sox9* y *Sox8* en los testículos adultos, hemos inducido la ablación específica de *Sox9* en células de Sertoli de ratones adultos mutantes para *Sox8* utilizando el sistema de mutagénesis dirigida Cre-loxP inducible por tamoxifeno (TX). Con este fin, hemos utilizado dos líneas de ratón CreERT2 diferentes específicas de las células de Sertoli, una línea knock-in para *Wt1* (*Wt1-CreERT2*; Zhou *et al.* (2008)) y una línea transgénica BAC para *Sox9* (*Sox9-CreERT2*; Kopp *et al.* (2011)).

Eficiencia de la recombinasa CRE

En primer lugar, comprobamos la eficiencia de recombinación de CRE. Para ello introdujimos el alelo reportero R26R-EYFP en los ratones mutantes doble homocigotos *Sox9/8* (DKO), tanto *Sox9-CreERT2* como *Wt1-CreERT2*. La actividad de la recombinasa se indujo alimentando a los ratones de 2 meses (P60) con una dieta suplementada con TX durante un máximo de 30 días (ver Figura 4.1).

Los análisis de expresión de EYFP mediante inmunofluorescencia, mostraron que a los 10 días después del inicio del tratamiento con TX (10 datx, P70) ya había algunas células EYFP⁺ en las dos líneas CreERT2. El número de estas células fue aumentando con el tiempo, pero siempre había más células positivas en la línea *Sox9-CreERT2* que en la *Wt1-CreERT2*.

4. RESULTADOS

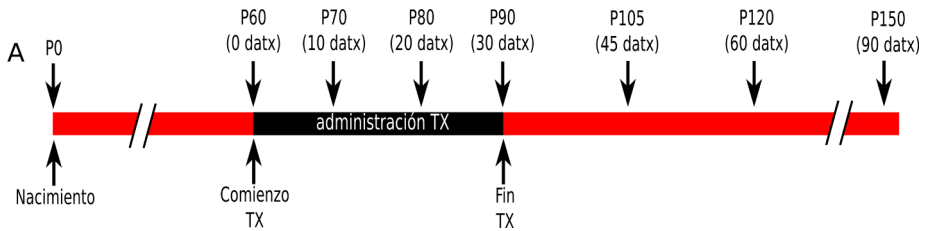


Figura 4.1: Administración de TX: Alimentamos a los ratones con una dieta suplementada con TX durante 30 días, entre P60 (0 datx) y P90 (30 datx). Después de este periodo, los ratones fueron alimentados con una dieta normal. Los principales estadios analizados están representados en la parte superior del diagrama

A partir de P150 (90 datx), la señal EYFP ocupaba todo el área de la sección del túbulo seminífero (ver Figura 4.2 A). Sin embargo, el hecho de que el citoplasma de las células de Sertoli es muy grande y tiene una forma compleja, junto con reducción tan severa que han experimentado los túbulos seminíferos de los ratones mutantes doble homocigotos para *Sox9/8* en células de Sertoli (*Sox9/8* SC-DKO, de ahora en adelante) en este proceso, hizo muy difícil identificar en estos testículos las células individualizadas EYFP⁺ para realizar un recuento. Por lo tanto, hicimos una inmunofluorescencia para SOX9 y contamos el número de células SOX9⁺ por sección transversal de los cordones testiculares. En P90 (30 datx) todos los túbulos seminíferos contenían muchas células positivas, pero el número se redujo en P120 (60 datx) y aun más en P150 (90 datx), donde algunos cordones testiculares estaban completamente desprovistos de células SOX9⁺ (ver Figura 4.2 B. En esta última etapa, el número de células SOX9⁺ por sección transversal de los túbulos seminíferos disminuyó a 15.39 ± 3.36 (reducción del 37%) en los testículos de los ratones *Wt1-CreERT2; Sox9^{f/f}; Sox8^{-/-} [Sox9/8 DKO (Wt1)]* y a 7.49 ± 3.61 (reducción del 69%) en los *Sox9-CreERT2; Sox9^{f/f}; Sox8^{-/-} [Sox9/8 DKO (Sox9)]*, en comparación con los controles (24.31 ± 2.94) (ver Figura 4.2C)

El hecho de que el número de células de Sertoli recombinantes SOX9⁻ en los ratones mutantes continuara disminuyendo durante varias semanas después de terminar el tratamiento con TX, sugiere que aparecen nuevas células recombinantes después de la administración del TX, posiblemente

por la persistencia de esta sustancia en el cuerpo, y que quizás, el transcrito de *Sox9* o la proteína, o ambas, son muy estables en las células adultas de Sertoli, de modo que el producto génico puede permanecer durante días o semanas en la célula después de la ablación génica. También observamos que la reducción de las células SOX9⁺ variaba entre los distintos cordones del testículo y entre los diferentes animales. Por ello, para los análisis posteriores seleccionamos las regiones más afectadas de los individuos más afectados.

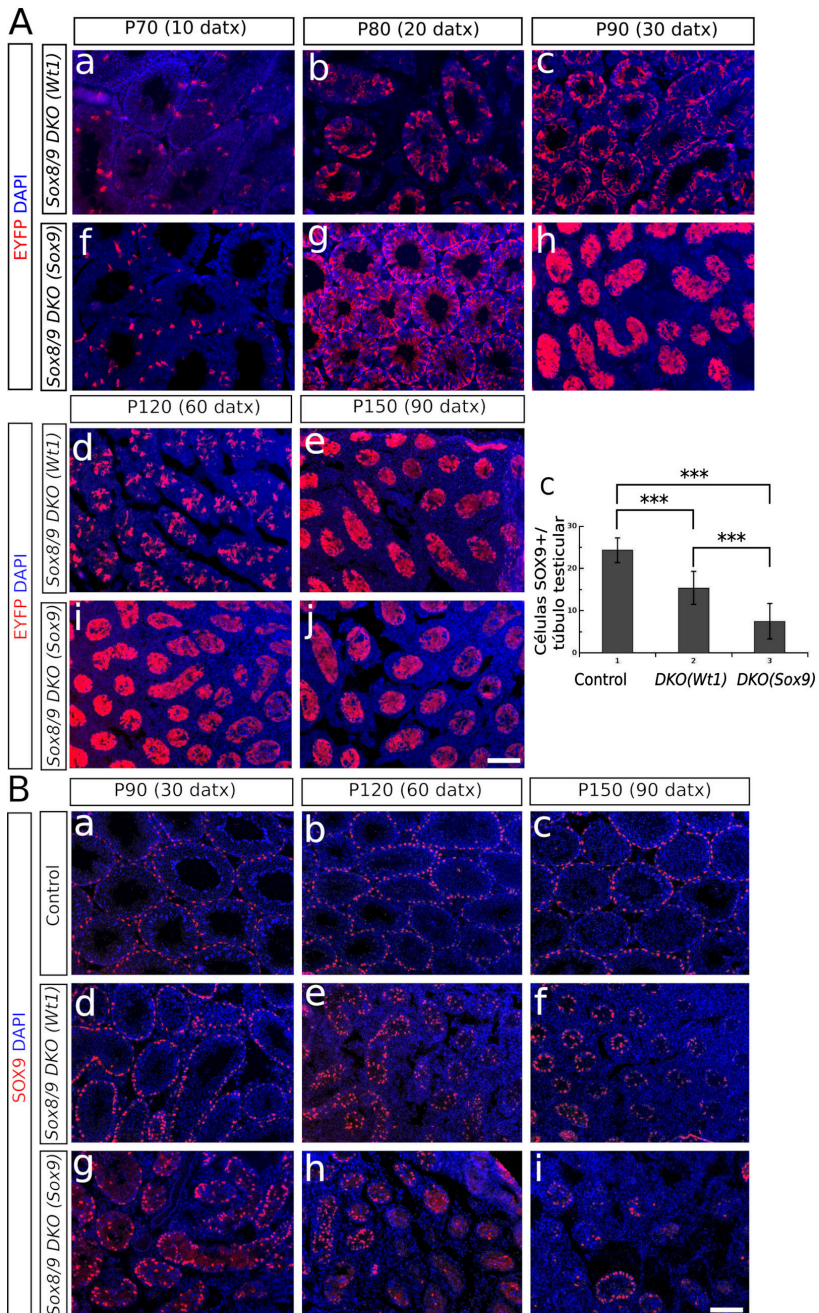
Redundancia alélica entre *Sox9* y *Sox8*

De acuerdo con la situación descrita por Barrionuevo *et al.* (2009) durante las etapas embrionarias del desarrollo gonadal, observamos que el fenotipo testicular de los distintos mutantes compuestos *Sox9/8* adultos aumentaba en severidad con el número de alelos mutantes *Sox9/8* (Ver Figura 4.3 y Cuadro 4.1). La redundancia funcional entre *Sox9* y *Sox8* también se ha puesto de manifiesto en otros tejidos durante el desarrollo, como en el retina (Muto *et al.*, 2009) y en la médula espinal (Stolt *et al.*, 2005).

Figura 4.2 : Eficiencia de recombinación CRE en ratones SC-DKO:

(A) Inmunofluorescencia para la proteína EYFP en ratones mutantes a diferentes puntos después del inicio del tratamiento con TX. El número de células EYFP⁺ incrementa con el tiempo (de a-e y de f-j). (B) Inmunofluorescencia para SOX9 en testículos controles (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) (a, b y c) y en testículos SC-DKO (d-i) a diferentes puntos después del inicio del tratamiento con TX. El número de células SOX9⁺ disminuye con el tiempo. (C) Comparación del número medio de células SOX9⁺ por sección transversal de los túbulos seminíferos en testículos controles (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) y mutantes. Todas las comparaciones por pares muestran diferencias estadísticamente significativas (*t*-student de dos colas, *p* < 0.001 en todos los casos). La barra de escala en Aj y en Bi representa 100 μm en A y B respectivamente.

4. RESULTADOS



4.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO

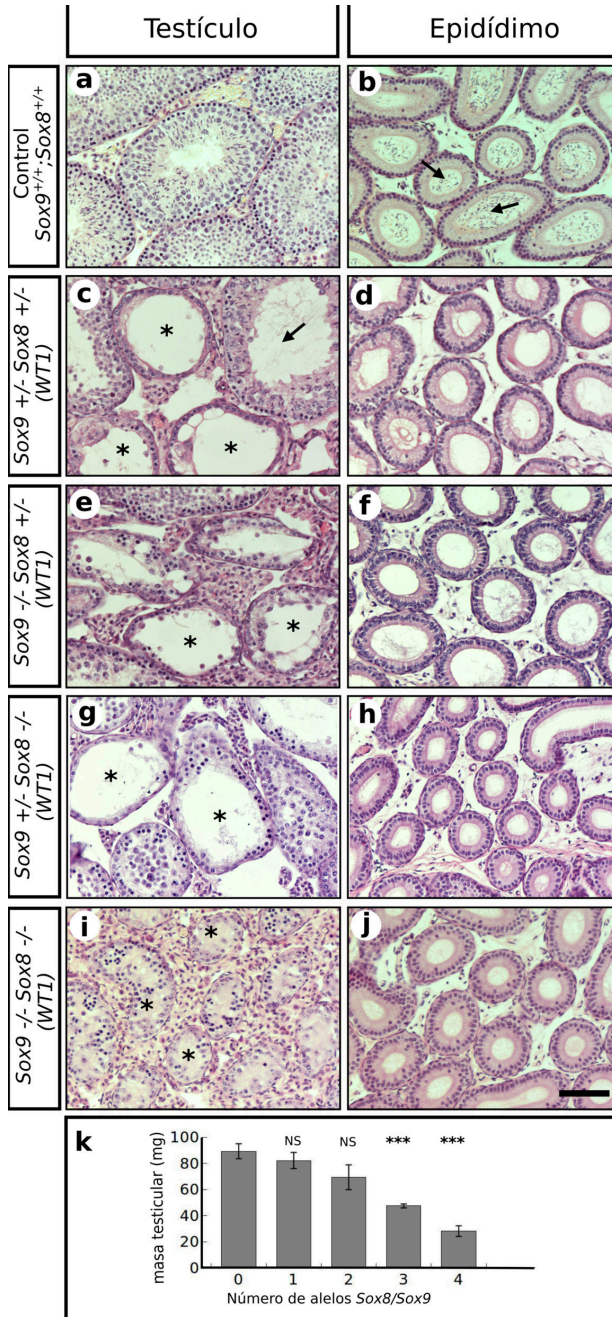
Genotipo	<i>Sox9</i> ^{+/+} <i>Sox8</i> ^{+/+} (<i>Wt1-Cre</i>)	<i>Sox9</i> ^{+/-} <i>Sox8</i> ^{+/-} (<i>Wt1-Cre</i>)	<i>Sox9</i> ^{+/-} <i>Sox8</i> ^{-/-} (<i>Wt1-Cre</i>)	<i>Sox9</i> ^{-/-} <i>Sox8</i> ^{+/-} (<i>Wt1-Cre</i>)	<i>Sox9</i> ^{-/-} <i>Sox8</i> ^{-/-} (<i>Wt1-Cre</i>)
Num. alelos mutados	Control	2	3	3	4
Túbulos seminíferos normales	++++	++	+	+	+
EspERMATOCITOS	++++	+++	++	++	+
EspERMATOCITOS en epidídimo	++++	-	-	-	-
Túbulos seminíferos en degeneración	-	++	++	+++	++++
Túbulos seminíferos formados sólo por células de Sertoli	-	-	++	++	++
Cordones testiculares	-	-	+	+	+++
Descamación en el testículo	-	++	++	++	+
Descamación en el epidídimo	-	-	++	++	+

Cuadro 4.1: Características morfológicas de mutantes *Sox9/8*: Abundancia relativa de las características morfológicas más relevantes observadas en los testículos de los ratones control P120 y mutantes *Sox9/8* 60 días después de la administración de TX durante 5 días con una aguja de alimentación. Categorías de abundancia relativa: (-) no presente, (+) esporádico, (+++) escaso, (++++) abundante, (+++++) generalizado.

4. RESULTADOS

Figura 4.3 : Redundancia *Sox8/9*: Tinción con hematoxilina-eosina de secciones transversales de testículos P120 (columna izquierda) y epidídimos (columna derecha) de ratones control (a-b) y de cuatro tipos de ratones *Sox9/8* DKO (*Wt1*) que difieren en el número de alelos mutantes *Sox9/8* 60 días después de la administración de TX durante 5 días con una aguja de alimentación (c-j). Se pone de manifiesto el papel redundante para *Sox9* y *Sox8* en el mantenimiento de la arquitectura de los cordones testiculares adultos. Los ratones mutantes mostraron varios grados de regresión testicular correlacionados con el número de alelos mutados. Los mutantes doble homocigotos mostraron el mayor grado de degeneración testicular, con todos los túbulos seminíferos transformados en cordones testiculares sólidos y estériles (i). Los túbulos seminíferos de los testículos controles fueron normales, sin embargo, los túbulos seminíferos de los ratones mutantes mostraron varias anormalidades, incluyendo un aumento de la luz tubular (flecha en c) y diferentes grados de depleción de las células germinales (asteriscos en c, e, g, e i). Sólo los epidídimos controles contenían espermatozoides abundantes (flechas en b), mientras que los de ratones mutantes eran completamente vacíos (d, f, h y j). Consecuentemente, la masa testicular de los ratones mutantes disminuyó a medida que el número de alelos mutantes *Sox9/8* aumentaba en sus genotipos (k). Las barras de escala mostradas en j representan 50 μm para todas las micrografías

4.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO



Evolución del fenotipo testicular en los ratones mutantes *Sox9/8* DKO

O'Bryan *et al.* (2008) describieron una línea de ratones *Sox8*^{-/-} en la que se producía una desregulación progresiva de la espermatogénesis y los ratones se quedaban estériles en P150. Por el contrario, nuestros mutantes para *Sox8* (Sock *et al.*, 2001) no mostraron un fenotipo testicular tan severo y los machos eran fértiles incluso hasta P180. A nivel histológico, los testículos de nuestros ratones *Sox8*^{-/-} fueron normales hasta P120, pero posteriormente mostraron signos de descamación de células germinales (Ver figura 4.4 a-f). Las diferencias en el trasfondo genética entre las dos líneas *Sox8*^{-/-} podrían explicar estas discrepancias fenotípicas. Los testículos controles tratados con TX fueron similares a los no tratados, excepto entre P80 (20 datx) y P120 (60 datx) y sobre todo en P90 (30 datx), cuando mostraron signos de degeneración en algunos túbulos seminíferos, pero se recuperaron después (ver Figura 4.4 a-l). Los testículos de los ratones *Sox9/8* DKO (*Sox9*) fueron similares a los controles tratados con TX en P70 (10 datx) a excepción de algunos túbulos que tenían el lumen agrandado (Figura 4.4 s). En P80 (20 datx), sólo unos pocos túbulos seminíferos mostraban signos de degeneración (retracción y reducción de células germinales), mientras que en P90 (30 datx) estos signos fueron frecuentes. En muchos casos, se vieron túbulos formados sólo por células de Sertoli (Figura 4.4 t,u). En P120 (60 datx), los túbulos se habían convertido en cordones testiculares sólidos cuyo diámetro se redujo aún más reducido en P150 (90 datx) (figura 4.4 v,w). Algunos ratones continuaron exhibiendo este fenotipo en P180 (120 datx), mientras que otros se mostraban más afectados. En estos últimos ratones, las células de Sertoli y las células germinales desaparecieron completamente (Figura 4.4 x). En estadios aún más avanzados, todos los ratones presentaron este fenotipo testicular severo. Los ratones *Sox9/8* DKO (*Wtl*) exhibieron un fenotipo testicular similar (Figura 4.4 m-r).

La degeneración progresiva del fenotipo testicular de los ratones *Sox9/8* SC-DKO fue evidente cuando analizamos la abundancia relativa de los características morfológicos testiculares más relevantes entre P70 (10 datx) y P180 (120 datx) (Cuadro 4.2). En contraste, las células de Leydig parecían morfológicamente normales en los testículos mutantes.

4.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO

Datx	10	20	30	60	90	120
Túbulos seminíferos normales	++++	+++	++	+	-	-
Espermatocitos	++++	+++	++	+	-	-
Esperma en epidídimo	++++	+++	-	-	-	-
Túbulos seminíferos en degeneración	+	++	+++	++++	-	-
Descamación de células germinales	+	+	++	++	-	-
Túbulos seminíferos formados sólo por células de Sertoli	-	-	++	++	-	-
Cordones testiculares inactivos	-	-	+	+++	++++	++++
Cordones testiculares acelulares	-	-	-	-	-	++++

Cuadro 4.2: Morfología testicular en *Sox9/8* DKO: Abundancia relativa de las características morfológicas más relevantes observadas en el tiempo de la regresión testicular en ratones *Sox8/Sox9* DKO. Categorías de abundancia relativa: (-) no presente, (+) esporádico, (+++) escaso, (++++) abundante, (+++++) generalizado.

4. RESULTADOS

Estos resultados indican que los alelos *Sox8* y *Sox9* actúan de forma redundante en las células de Sertoli adultas, siendo necesarios para mantener la integridad de los túbulos seminíferos de los testículos funcionales.

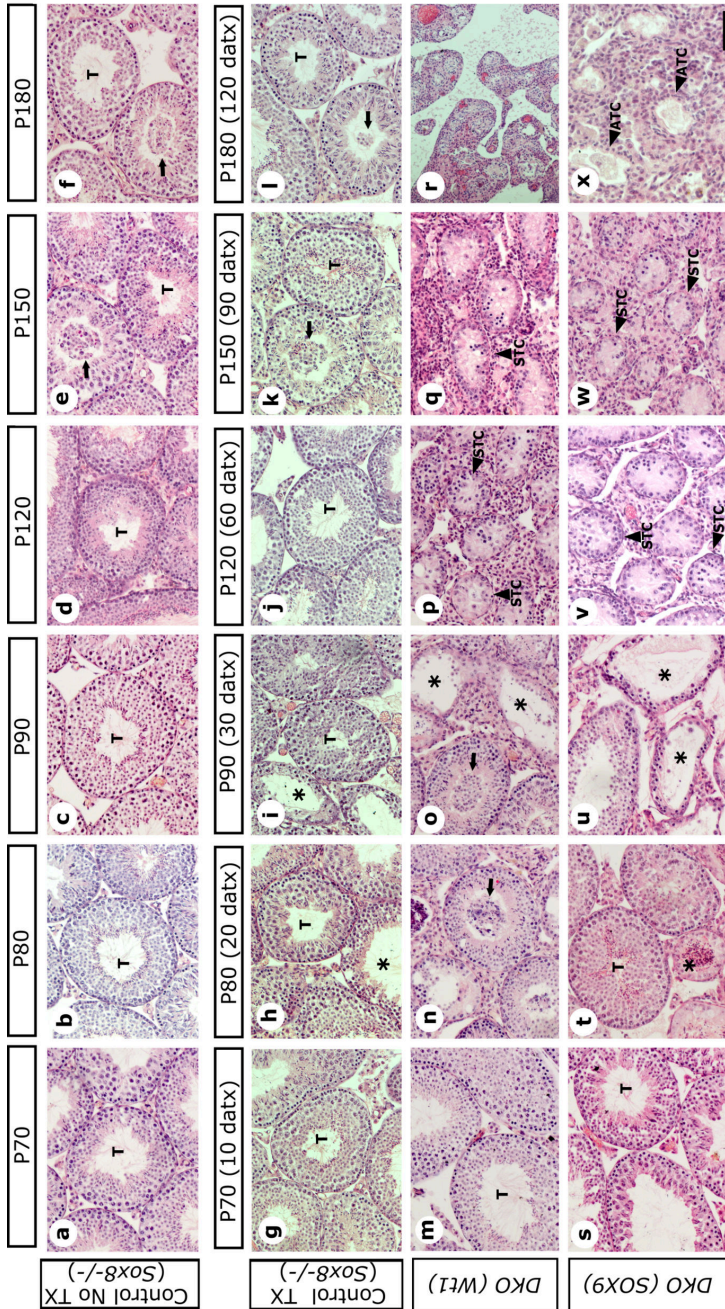
4.1.2 Estado funcional de las células somáticas y germinales en testículos *Sox9/8* SC-DKO

Para caracterizar mejor el fenotipo mutante, lo siguiente que estudiamos fue la expresión de varios marcadores de células somáticas y germinales. Así, la **LAMININA**, el componente principal de la membrana basal (Richardson *et al.*, 1995) persistió en los testículos de ratones SC-DKO en P150 (90 datx) y P180 (120 datx) (Figura 4.5 b,c). La expresión de la α -actina del músculo liso (***Acta2***) se detectó tanto en las células mioides peritubulares (PM) como en las fibras arterio-musculares de los testículos controles tratados con TX y de los ratones SC-DKO en P150 (90 datx) (figura 4.5 d,e). En contraste, en P180 (120 datx), la señal ACTA2 sólo persistió en las fibras arteriales siendo casi indetectable en las células PM (figura 4.5 f). Esto muestra que los cordones acelulares muy afectados de los testículos SC-DKO han perdido no sólo las células de Sertoli y las germinales, sino también las células PM.

CLAUDINA 11 es un componente esencial de las uniones estrechas, las principales estructuras de unión que forman la barrera hematotesticular

Figura 4.4 : Fenotipo testicular en SC-DKO: Las micrografías muestran la evolución temporal del fenotipo testicular de ratones control y SC-DKO. Las secciones testiculares están teñidas con H-E y pertenecen a ratones *Sox8*^{-/-} sin tratar (a-f), ratones *Sox8*^{-/-} tratados con TX, ratones *Sox8/9* DKO (*Wt1*) (m-r) con TX y ratones *Sox8/9* DKO (*Sox9*) (s-x) con TX en diferentes puntos temporales, entre P70 (10 datx) y P180 (120 datx). T, túbulos seminíferos normales; las flechas indican células germinales descamadas; los asteriscos marcan los túbulos que muestran algún grado de degeneración (lumen agrandado o túbulos sólo con células de Sertoli); el asterisco doble marca el espacio intersticial acelular; STC, los cordones testiculares retraídos; ATC, los cordones testiculares acelulares. La barras de escala en x representa 50 μ m para todas las micrografías.

4.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO



4. RESULTADOS

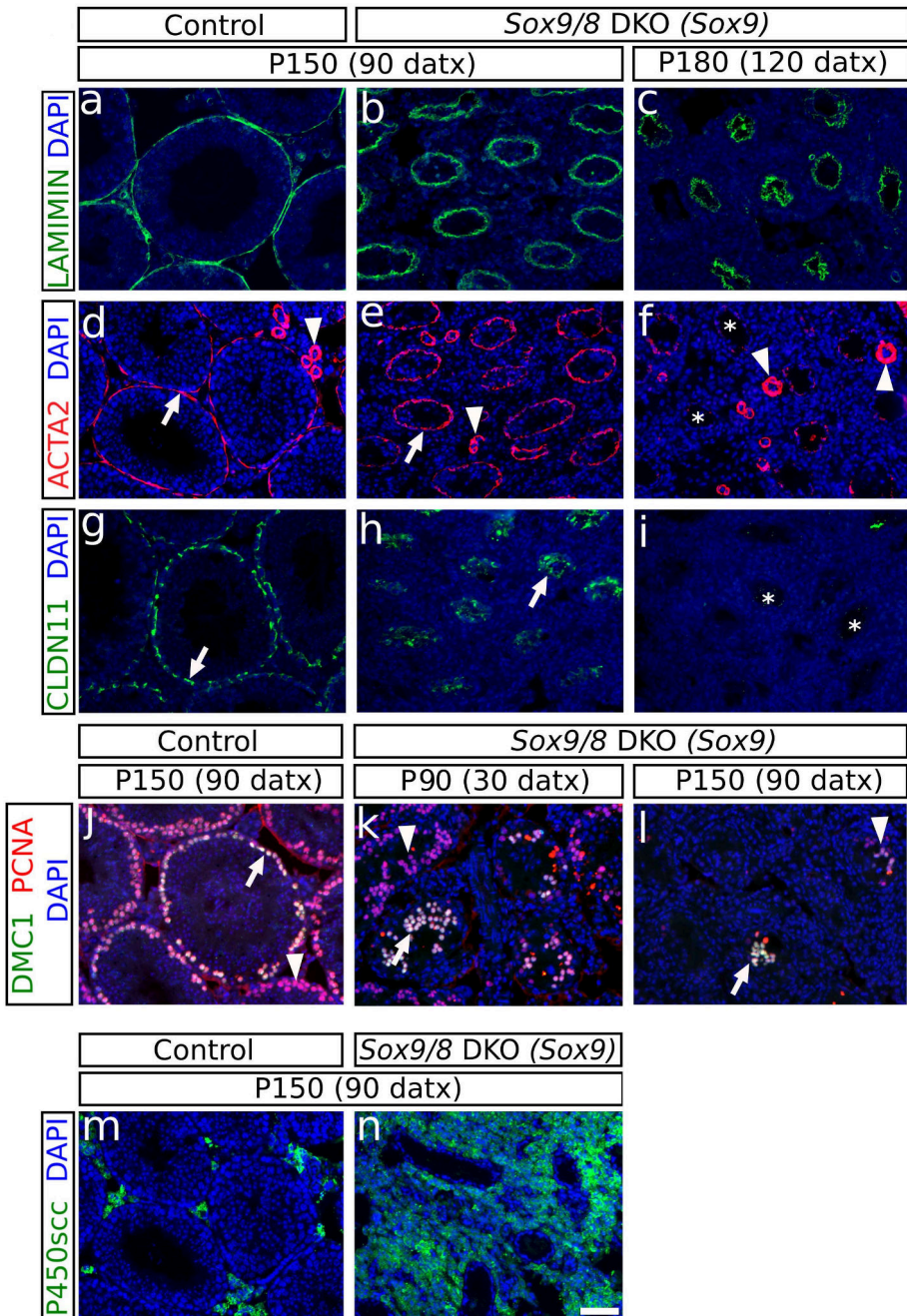
(BTB). La expresión del gen *claudin11* fue similar en los controles y dobles mutantes antes de P150 (90 datx) (no mostrado), pero se redujo drásticamente en P150 (90 datx) y en P180 (120 datx) no se detectó señal para CLAUDINA 11 en los testículos mutantes *Sox9/8* (Figura 4.5 g-i), lo que indica que la BTB no es funcional en estos testículos. Para testar esta hipótesis, analizamos la permeabilidad de la BTB de ratones en P120 (60 datx) inyectando un trazador de biotina bajo la túnica albugínea y observamos que los testículos controles tenían una BTB funcional, mientras que la BTB de los mutantes se había vuelto permeable (Figura 4.6).

También realizamos inmunofluorescencia para **PCNA**, que se expresa en espermatogonias mitóticas y espermatocitos en zigotene y paquitene temprana, pero no en los espermatocitos en leptotene (Chapman & Wolgemuth, 1994), y para **DMC1**, una proteína de recombinación meiótica que marca los espermatocitos en zigotene-paquitene (Yoshida *et al.*, 1998). En P90 (30 datx), la mayoría de los túbulos seminíferos mutantes mostraron una clara reducción de la actividad espermatogénica y algunos espermatozoides estaban localizados atípicamente en la región interna de los túbulos (Figura 4.5 k) y no en la periferia, como se observa en los testículos de control tratado con TX (Figura 4.5 j). En los testículos de P120 (60 datx), los espermatozoides eran escasos y en la mayoría de los túbulos sólo se veían espermatogonias proliferantes (no mostrado), mientras que en los de P150 (90 datx), tanto las espermatogonias como los espermatozoides habían desaparecido en la mayoría de los túbulos (Figura 4.5 l). Estos resultados indican que la espermatogénesis se interrumpe en los testículos con células de Sertoli deficientes para *Sox9* y *Sox8*.

A diferencia de otras células somáticas, las células de Leydig no parecen estar muy afectadas en los testículos de los ratones *Sox9/8* SC-DKO. Estas células no se transdiferencian en células de la teca ya que nunca expresan *Foxl2* (como lo hacen las células de la teca; no mostrado), y mantienen su función esteroideogénica durante mucho tiempo después de la ablación de *Sox9*, como se deduce de la expresión de **P450scc**, un citocromo implicado en la síntesis de testosterona (Figura 4.5 m,n). Además, la enzima productora de testosterona *HSD17b3* y el marcador de las células funcionales adultas de Leydig *Insl3* se expresan a niveles altos en los testículos mutantes (Figura 4.7).

Figura 4.5 : Estado funcional de SC y GC en SC-DKO: Análisis del estado funcional de las células de Sertoli y las células germinales de los testículos *Sox9/8* SC-DKO. Marcadores moleculares somáticos (a-i y m-n) y de células germinales (j-l) Inmunofluorescencia para LAMININA (a-c), ACTA2 (d-f) y CLAUDINA 11 (g-i) tanto en controles (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) con TX en P150 (90 datx) (a, d y g) como en los testículos SC-DKO en P150 (90 datx) (b, e y h) y P180 (120 datx) (c, f e i). Las flechas marcan la expresión de ACTA2 en los túbulos seminíferos (d y e) y CLAUDINA 11 (g y h); las puntas de flecha marcan la expresión de ACTA2 en las fibras de músculo liso (d-f). Los asteriscos marcan los cordones testiculares que carecen de expresión ACTA2 (f) o CLAUDINA 11 (i). Doble inmunofluorescencia para PCNA y DMC1 que muestra la reducción de la espermatogénesis con el tiempo en los testículos controles (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) con TX en P150 (90 datx) (j) y en los ratones SC-DKO en P90 (30 datx) y P150 (90 datx) (k,l). Las flechas marcan los espermatoцитos en los que colocalizan las dos proteínas; las puntas de flechas marcan las espermatogonias proliferativas que expresan PCNA pero no DMC1. Expresión de P450sc (fluorescencia verde) en células de Leydig de testículos controles (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) con TX (m) y testículos SC-DKO (n) en P150 (90 datx). La barra de escala en n representa 50 μ m para todas las imágenes.

4. RESULTADOS



4.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO

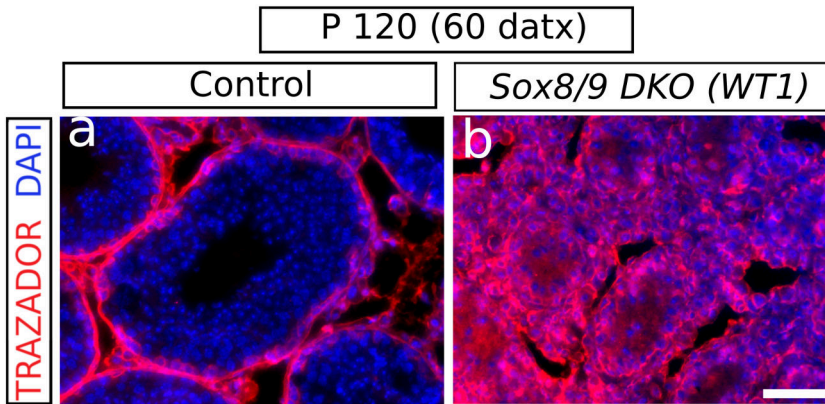


Figura 4.6: Estado funciones de la BTB en testículos *Sox9/8* SC-DKO:

La localización del trazador de biotina (fluorescencia roja) muestra que la BTB de los testículos controles (*Sox9^{f/f}; Sox8^{-/-}*) es impermeable (a) ya que no entra en el compartimento adluminal de los túbulos seminíferos, mientras que en el mutante es permeable (b), el trazador se observa dentro de los túbulos. La barra de escala en b representa 50 μm para a y b.

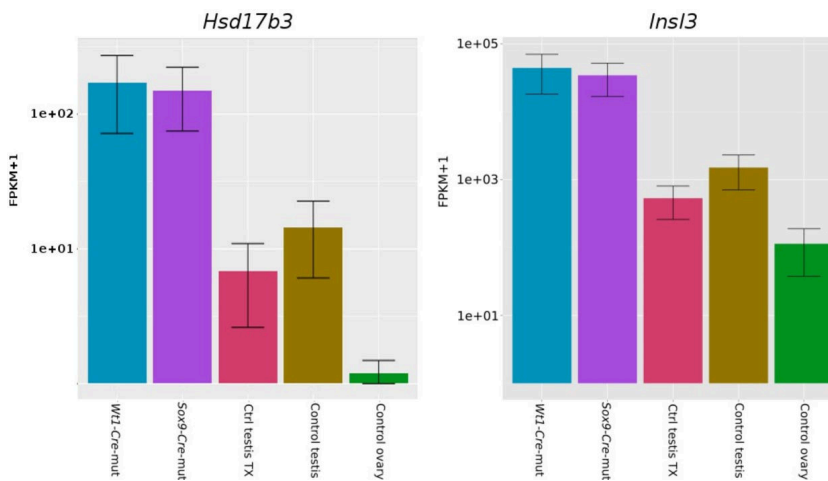


Figura 4.7: Marcadores de Leydig adultos: Los gráficos de barras muestran la expresión de dos marcadores de células de Leydig adultas: *Hsd3b1*: 3β -hydroxysteroid dehydrogenase; *Ins13*: *Insulina-like 3*. Datos obtenidos del análisis de nuestro transcriptoma.

4. RESULTADOS

4.1.3 Reprogramación genética de testículo a ovario en ausencia de *Sox9* y *Sox8* en testículos de ratones adultos

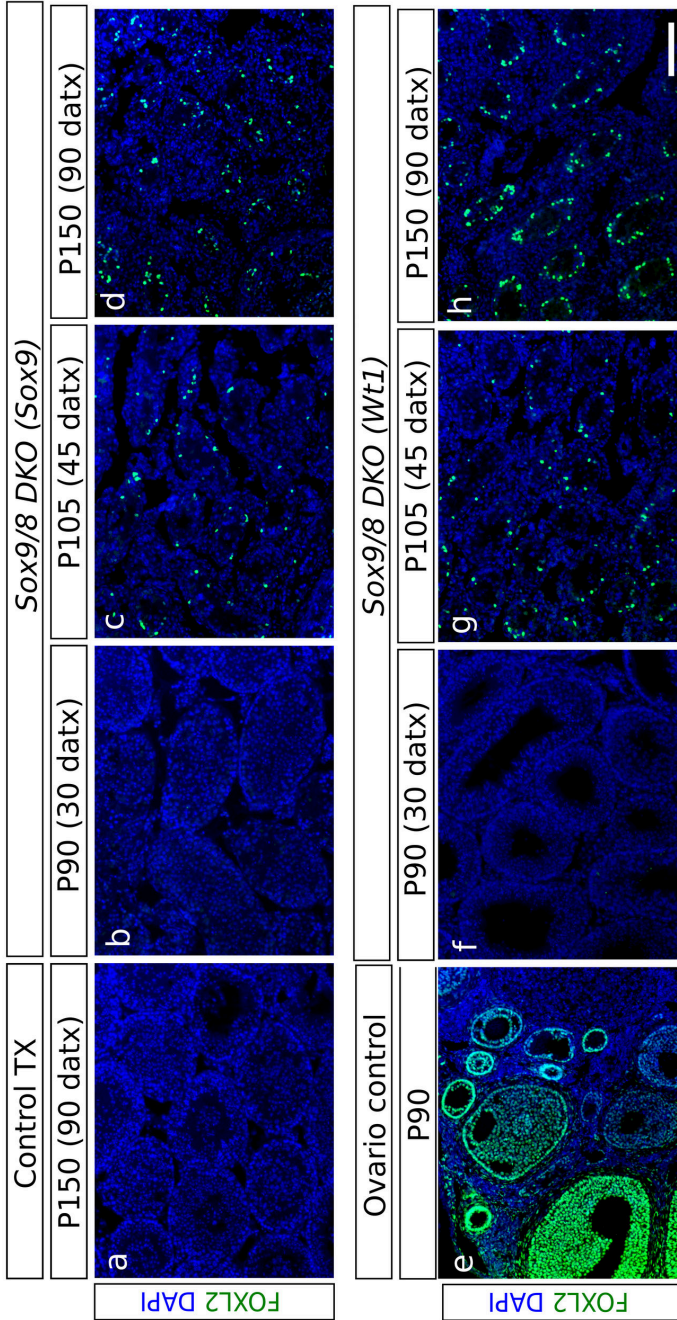
La pérdida de *Foxl2* en las células de la granulosa adultas conduce a la reprogramación genética de ovario a testículo, incluyendo la transdiferenciación de las células de la granulosa en células de Sertoli que expresan *Sox9* (Uhlenhaut *et al.*, 2009). Por el contrario, *Foxl2* aumenta cuando se elimina *Sox9* en células de Sertoli embrionarias mutantes para *Sox8* después de la etapa de determinación del sexo (Georg *et al.*, 2012). Para comprobar si en nuestros ratones *Sox9/8* SC-DKO ocurría un fenómeno similar, realizamos inmunofluorescencia para FOXL2. Pudimos observar que en P90 (30 datx), la proteína FOXL2 estaba completamente ausente en los testículos mutantes, sin embargo, en P105 (45 datx), las células positivas estaban presentes en casi todos los cordones testiculares, y en P150 (90 datx), los ratones más afectados mostraron muchas células FOXL2⁺ en casi todos los cordones testiculares, en ambas líneas *Sox9/8* SC-DKO (Figura 4.8). Estos resultados muestran que la transdiferenciación también ocurre en las células de Sertoli adultas *Sox9/8* DKO.

A la vista de estos datos, decidimos realizar transcriptomas de testículos controles no tratados en P150, de testículos controles y mutantes con TX en P150 (90 datx) y de ovarios control.

Nuestros resultados indican que los testículos *Sox9/8* SC-DKO presentan una llamativa feminización del transcriptoma testicular. La Figura 4.9 A muestra un “heat-map” en el que se incluyen 12 380 genes expresados diferencialmente entre las cinco condiciones analizadas. La lista completa de genes con expresión diferencial se puede descargar de

Figura 4.8 : Expresión de *Foxl2* en SC-DKO: Se muestra la expresión de *Foxl2* en células somáticas adultas *Sox9/8* SC-DKO mediante inmunofluorescencia para FOXL2 (fluorescencia verde) en ratones *Sox8/9* DKO (*Sox9*) con TX (b-d) y ratones *Sox8/9* DKO (*Wt*) con TX (f-h) a distintos puntos en el tiempo. Control con TX (*Sox9^{f/f}; Sox8^{-/-}*) en P150 (90 datx) (a), testículos *Sox8/9* SC-DKO analizados en P90 (30 datx) (b,f), en P105 (45 datx) (c,f) y en P150 (90 datx) (d,h), así como en ovario control (e). La barra de escala en h representa 150 μ m para todas las micrografías

4.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO



4. RESULTADOS

<https://doi.org/10.7554/eLife.15635.013> (Figure 2–source data 1).

A excepción de unos pocos grupos de genes, la mayoría de los genes en los testículos mutantes adoptaron un patrón de expresión similar a los del ovario (ver Figura 4.9 A y 4.10).

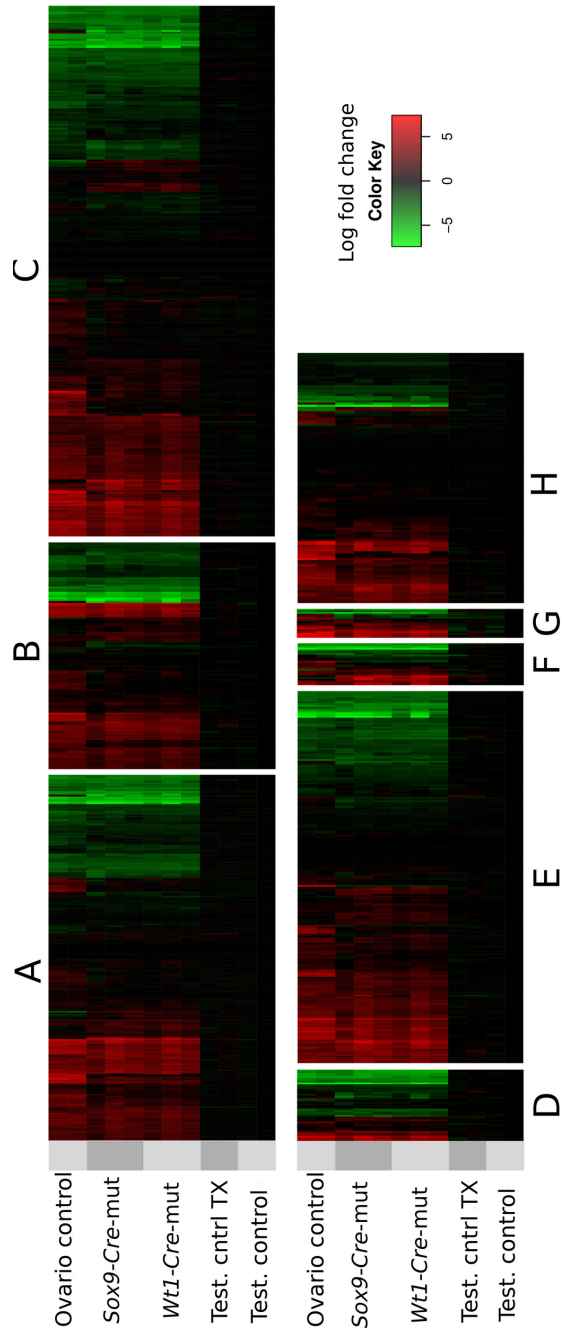
Los análisis de grupo de todos los genes, tanto por réplicas como por condiciones, mostraron que los mutantes están agrupados, sin distinción clara entre las líneas *Sox9-CreER* y *Wt1-CreER* (Figura 4.11). De manera similar, los conjuntos de genes por pares que muestran expresión diferencial significativa con $\alpha < 0.05$ confirmaron que el número de genes diferencialmente expresados (DE) es mayor cuando se comparan los testículos mutantes con los controles que cuando se comparan con los ovarios (Figura 4.12 A). Por consiguiente, el mapa de distancia es mayor entre los testículos mutantes y controles que entre los testículos mutantes y el ovario (Figura 4.12 B). Obtuvimos resultados similares cuando comparamos isoformas, sitios de inicio de la transcripción o secuencias de DNA codificantes (no mostrado).

A continuación, seleccionamos 39 genes específicos de células somáticas del ovario y 33 genes específicos de oocitos utilizando bioGPS (<http://biogps.org>) y los “*heat-map*” revelaron que la reprogramación celular que observamos en los testículos SC-DKO sólo afecta a las células somáticas (Figura 4.9 B). Un ejemplo lo encontramos en la Figura 4.13 A, en el que se muestran seis gráficos de barras correspondientes a seis genes marcadores de células de la granulosa adultas. En todos los casos, la expresión de estos genes estaba aumentada en las células de Sertoli mutantes, mostrando un patrón de expresión similar al de los ovarios. Además, dentro de los cordones testiculares de los SC-DKO encontramos algunas células FOXL2⁺ que también expresaban la enzima aromatasa (figura 4.13 B), evidenciando que, además de *Foxl2*, otros genes expresados normalmente por las células de la granulosa también son transcritos y traducidos en los testículos *Sox9/8* SC-DKO.

Figura 4.9 : Feminización del transcriptoma testicular: (A) *Heatmap* que muestra los 12380 genes diferencialmente expresados con $\alpha < 0.005$ cuando se comparan gónadas adultas controles (*Sox9^{f/f}*) y mutantes. El $\log_2(\text{FPKM}+1)$ de cada gen en cada condición ha sido dividido por el valor correspondiente en los testículos control. El tratamiento con TX no ha afectado a la expresión génica. Los colores rojos indican genes sobre-regulados con respecto a sus niveles de expresión de los testículos control y los colores verdes indican genes que han disminuido su expresión. (B) *Heatmaps* de genes seleccionados específicos de las células somáticas del ovario y de oocitos.

Figura 4.10 : Heatmaps: Se muestra la expresión de genes implicados en 8 rutas seleccionadas (A-H), en relación con su expresión en los testículos control: Los conjuntos de genes se obtuvieron de la base de datos “Pathway Unification Database”, a excepción de la familia de genes de la Miosina, que la obtuvimos de la lista de genes diferencialmente expresados. Las vías, URL y el número de genes de cada ruta son los siguientes: **(A)** Uniones celulares Sertoli-Sertoli (<http://pathcards.genecards.org/pathway/543>) 213 genes **(B)** Uniones celulares Sertoli-germinales (<http://pathcards.genecards.org/pathway/1181>) 140 genes **(C)** Uniones estrechas epiteliales (<http://pathcards.genecards.org/pathway/448>) 329 genes **(D)** Regulación de los microtúbulos del citoesqueleto (<http://pathcards.genecards.org/pathway/792>) 44 genes **(E)** Regulación del citoesqueleto de actina “SuperPath” (http://pathcards.genecards.org/card/regulation_of_actin_cytoskeleton) 230 genes **(F)** Familia de la Miosina 26 genes **(G)** Interacciones células-matriz extracelular (<http://pathcards.genecards.org/pathway/286>) 18 genes **(H)** Moléculas de adhesión celular (<http://pathcards.genecards.org/pathway/1823>) 145 genes. Las listas completas de los genes pueden descargarse de <https://doi.org/10.7554/eLife.15635.031> (Supplementary file 1. Complete lists of genes included in the 8 molecular pathways mentioned in Figure 2—figure supplement 2).

4. RESULTADOS



4.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO

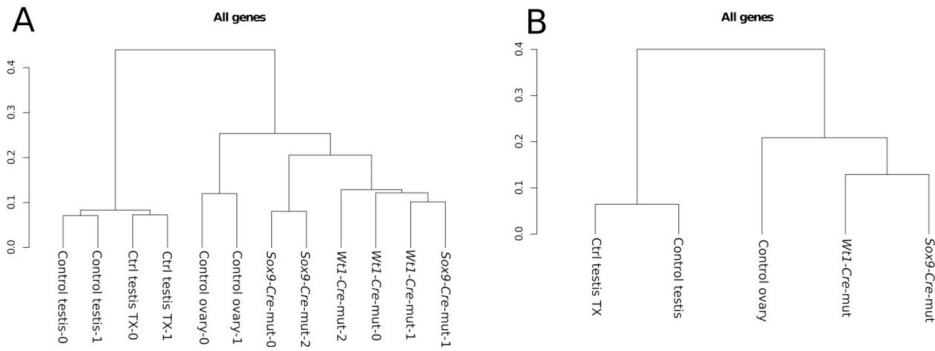


Figura 4.11: Dendrograma de réplicas y condiciones: Análisis de clusterización de (A) réplicas y (B) condiciones. Los patrones de expresión génica de los testículos mutantes están más cerca de los patrones de expresión de los ovarios que de los testículos normales. Los controles con y sin TX también se agrupan como esperábamos.

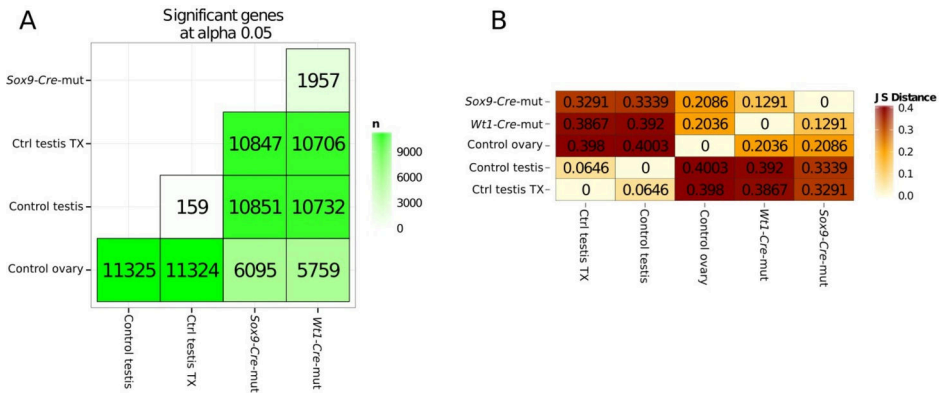
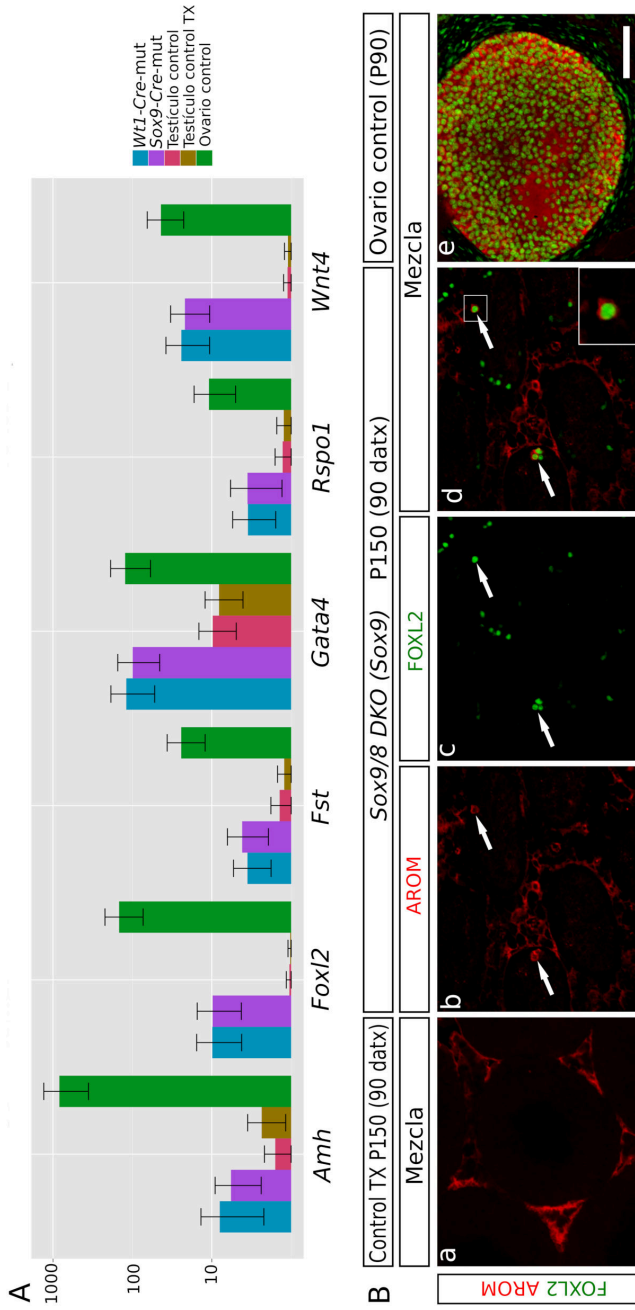


Figura 4.12: Distancias de JS: Cuantificación de genes con expresión diferencial y distancias Jensen-Shannon (JS) entre condiciones. (A) Número de genes que muestran expresión diferencial comparados por pares entre las diferentes condiciones. (B) *Heatmap* de distancias de Jensen-Shannon (JS) entre las condiciones.

Figura 4.13 : Reprogramación de las células somáticas: (A) Gráficos de barras de seis genes específicos de las células somáticas del ovario que están sobre-expresados aumentados en los testículos mutantes. (B) Inmunofluorescencia para AROMATASA (rojo) y FOXL2 (verde) de testículo control tratado con TX ($Sox9^{f/f}; Sox8^{-/-}$) (a), testículos mutantes (b-d), y ovario control (e). Las flechas marcan las células de Sertoli reprogramadas que muestran simultáneamente la expresión de AROMATASA y FOXL2. La barra de escala mostrada en Be representa $75 \mu\text{m}$ en todas las micrografías

4.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO

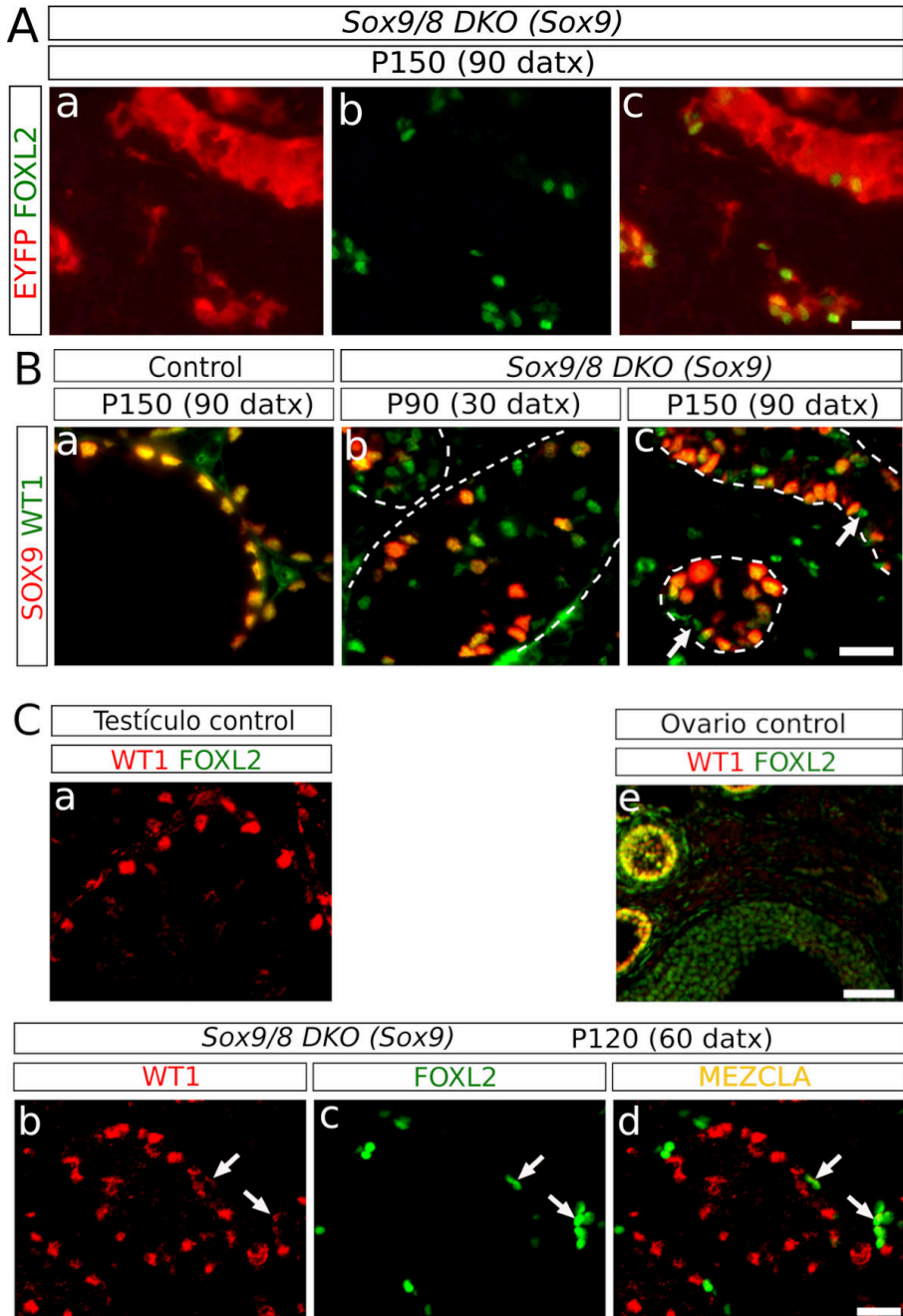


4.1.4 Transdiferenciación Sertoli-granulosa en los testículos adultos *Sox9/8* SC-DKO

A continuación, investigamos cuál era el origen de las células FOXL2⁺ similares a las células de la granulosa presentes en los testículos *Sox9/8* SC-DKO. Varias evidencias muestran que las células FOXL2⁺ presentes en los testículos mutantes se originan de las células de Sertoli carentes de *Sox9/8*. 1) Los dos promotores que utilizamos para dirigir la expresión de CRE (*Sox9* y *Wt1*) son específicos de las células de Sertoli, lo que indica que la transdiferenciación se produce directamente en este tipo celular. 2) Observamos que las células FOXL2⁺ siempre están localizadas dentro de los cordones testiculares que tienen expresión fuerte para la proteína reportera EYFP (Figura 4.14 A). 3) También analizamos la expresión de WT1, un marcador de las células de Sertoli cuya expresión se mantiene después de la ablación de *Sox9/8* en células de Sertoli embrionarias de ratón (Barrionuevo *et al.*, 2009), y que se coexpresa con FOXL2 en las células de la granulosa de los folículos inmaduros, pero no maduros (Chun *et al.*, 1999) (Figura 4.14 Ce). En P90 (30 datx) observamos muchas células de Sertoli WT1⁺ que ya habían perdido la expresión de SOX9 (células verdes, Figura 4.14 Bb). El número de células WT1⁺ SOX9⁻ disminuyó en P150 (90 datx) (Figura 4.14 Bc), indicando que las células de Sertoli recombinantes se estaban perdiendo. Esta disminución en el número de células WT1⁺ SOX9⁻ Sertoli coincide con un aumento en el número de células FOXL2⁺ que retienen una tinción débil de WT1 o son WT1⁻ (figura 4.14 C), sugiriendo que las células FOXL2⁺ se originan de las células que anteriormente expresaban WT1, es decir, de las células de Sertoli. En conjunto, estos resultados indican que los testículos *Sox9/8* SC-DKO experimentan una transdiferenciación autónoma de células de Sertoli a granulosa que desencadena la reprogramación genética de testículos a ovarios que hemos observado en estas gónadas.

Figura 4.14 : Expresión de FOXL2 en células somáticas: Identificación de las células somáticas que expresan FOXL2. **(A)** Inmunofluorescencia doble para FOXL2 (verde, nuclear) y EYFP (rojo, citoplasmática) **(B)** Doble inmunofluorescencia para SOX9 y WT1 en P150 (90 datx) de testículos controles tratados con TX (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) (a) y testículos SC-DKO *Sox9/8* analizados en P90 (30 datx) (b) y P150 (90 datx) (c). Las líneas discontinuas marcan el contorno de los túbulos seminíferos. Las flechas marcan las células mutantes que expresan WT1 pero no SOX9. **(C)** Doble inmunofluorescencia para FOXL2 y WT1 tanto en el control tratado con TX (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) (a) como en los testículos mutantes SC-DKO *Sox9/8* analizados en P120 (60 datx) (b-d), así como en un ovario control (e). Las flechas señalan a las células mutantes que expresan ambas proteínas. La barra de escala en Ac representa 25 μm en A; la barra de escala en Bc representa 25 μm en B; la barra de escala en Cd representa 25 μm en Ca-d y la barra de escala en Ce representa 100 μm .

4. RESULTADOS



4.1.5 La transdiferenciación celular Sertoli-granulosa está mediada por la desregulación de *Dmrt1* en los testículos *Sox9/8* SC-DKO

Como se ha comentado anteriormente, la expresión de *Sox9* aumenta después de la ablación de *Foxl2* en células de la granulosa adultas (Uhlenhaut *et al.*, 2009) y se reduce después de la ablación de *Dmrt1* en células de Sertoli embrionarias (Matson *et al.*, 2011a), por ello, estudiamos el patrón de expresión de estos dos genes en los testículos de los mutantes *Sox9/8* SC-DKO. Observamos que las células que coexpresan SOX9 y FOXL2 eran raras en todas las etapas analizadas [12 de 203 células FOXL2⁺ coexpresaron SOX9 en P120 (60 datx)] (ver Figura 4.15 A), indicando que la expresión de *Foxl2* requiere la eliminación previa de ambas proteínas SOXE.

A continuación, estudiamos la expresión tanto de *Sox9* como de *Dmrt1* en los testículos de *Sox9/8* SC-DKO. Como *Dmrt1* se expresa tanto en las células de Sertoli como en las espermatogonias de los testículos adultos (Raymond *et al.*, 2000), utilizamos un tercer marcador, PCNA, que señala las espermatogonias, así como los espermatoцитos en zigotene y paquitene temprana. Mientras que todas las células de Sertoli en los testículos control mostraban una tinción fuerte tanto para DMRT1 como para SOX9 (SS, Figura 4.15 Ba), las células de Sertoli mutantes presentaban grados variables de intensidad de tinción tanto para SOX9 como para DMRT1, aunque normalmente su intensidad era paralela. Por lo tanto, en estos testículos también vimos células de Sertoli con una tinción débil tanto para DMRT1 como para SOX9 (WS). Consistente con esto, encontramos un número muy reducido de células que expresaban sólo DMRT1 en P90 (30 datx) (figura 4.15 Bb-d, células rojas (flecha); SOX9⁻ DMRT1⁺ PCNA⁻) y casi ninguna en P120 (60 datx) (Figura 4.15 Be-g). La tinción doble con WT1-DMRT1 confirmó que ya en P90 (30 datx) muchas células WT1⁺ (células de Sertoli) habían perdido la expresión de DMRT1 (células verdes en la Figura 4.15 Cb), mostrando que la expresión de *Dmrt1* se pierde después de la ablación de *Sox9* y antes de que la expresión de *Wt1* disminuya en los testículos SC-DKO. Además, como se observó para SOX9 y FOXL2 (ver arriba), DMRT1 y FOXL2 sólo colocalizan en un número reducido de células en los testículos de nuestros ratones *Sox9/8* SC-DKO

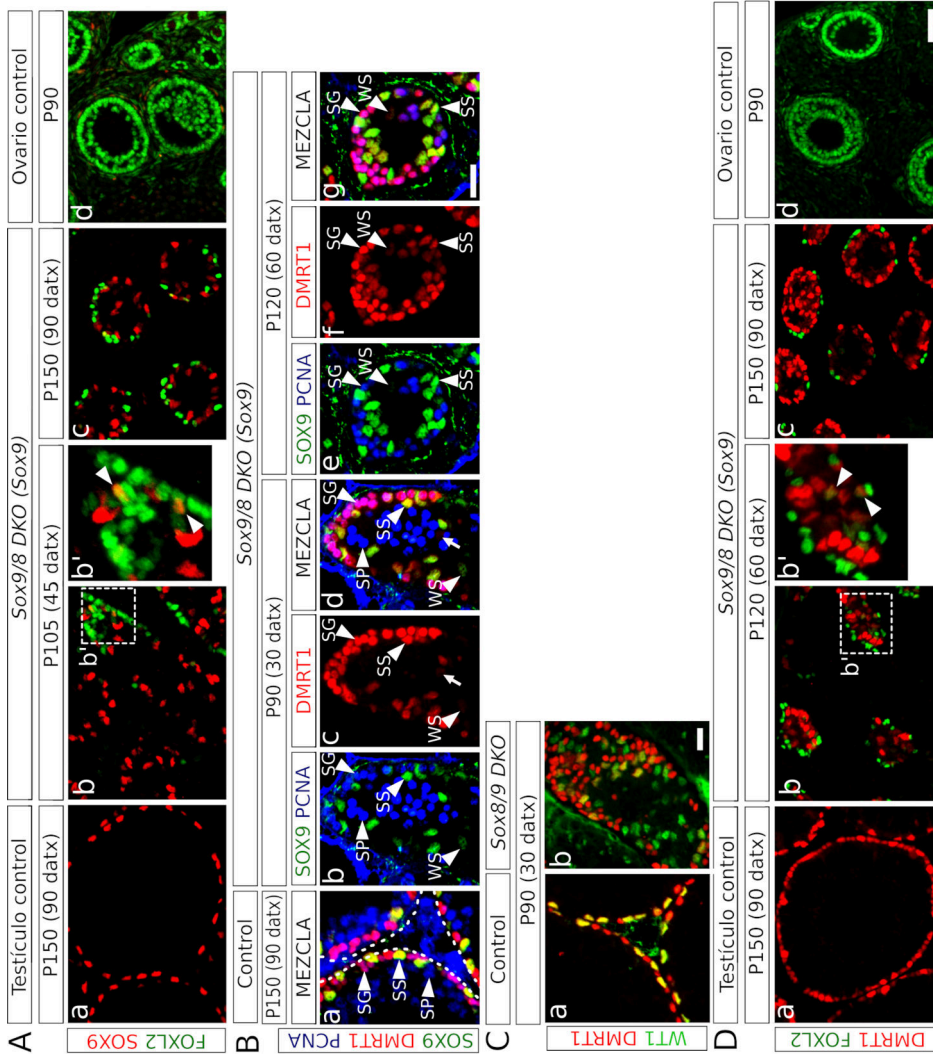
4. RESULTADOS

[16 de 127 células FOXL2⁺ coexpresaron DMRT1 en P120 (60 datx)]. (figura 4.15 D). En general, estos hallazgos apoyan la idea de que la SOX9 y SOX8 son necesarios para el mantenimiento de la expresión de *Dmrt1* en las células de Sertoli adultas y que estos factores promotores del testículo regulan negativamente a *Foxl2*.

Para comprobar esta hipótesis, comparamos los datos del microarray de testículos SC-*Dmrt1* KO en P28 generados por Zarkower (2011b) con los datos de secuenciación de RNA de nuestros mutantes SC-*Sox9/8* DKO

Figura 4.15 : Función de *Dmrt1*: en la transdiferenciación Sertoli-granulosa: (A) Inmunofluorescencia doble para SOX9 y FOXL2 en testículos control tratados con TX (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) (a), testículos mutantes SC-DKO *Sox9/8* analizados en P105 (45 datx) y P150 (90 datx) (b,c) y ovario control (d) (b' es una ampliación del área marcada en b). La colocalización de SOX9 y FOXL2 fue rara y las pocas células observadas mostraron fluorescencia débil para ambas proteínas (puntas de flecha en b'). (B) Inmunofluorescencia triple para SOX9, DMRT1 y PCNA (marcador de células germinales) en los testículos control tratados con TX (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) en P150 (90 datx) (a) y en testículos mutantes *Sox9/8* SC-DKO en P90 (30 datx) (b-d) y P120 (60 datx) (e-g). Se pueden identificar diferentes tipos de células: SS: Células de Sertoli con tinción fuerte para DMRT1 y SOX9 (SOX9⁺ DMRT1⁺ PCNA⁻; amarillo fuerte); WS: Células de Sertoli con tinción débil para DMRT1 y SOX9 (SOX9⁺ DMRT1⁺ PCNA⁻; amarillo pálido); SP: espermatocitos (SOX9⁻ DMRT1⁻ PCNA⁺; azul); SG: espermatogonias proliferantes (SOX9⁻ DMRT1⁺ PCNA⁺; púrpura), flecha (SOX9⁻ DMRT1⁺ PCNA⁻; rojo). La espermatogonias no proliferativas se podrían confundir en los ratones *Sox9/8* SC-DKO con las células de Sertoli recombinantes DMRT1⁺ SOX9⁻ en las que ya ha desaparecido SOX9, pero el número de células de este tipo es tan bajo que se pueden ignorar. (C) Inmunofluorescencia doble para DMRT1 y WT1 en controles tratados con TX (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) en P90 (30 datx) (a) y testículos mutantes (b). (D) Inmunofluorescencia doble para DMRT1 y FOXL2 en testículos controles tratados con TX (*Sox9^{f/f};Sox8^{-/-}*) en P150 (90 datx) (a), testículos mutantes *Sox9/8* SC-DKO (b-c) y ovario control (d) (b' es una ampliación del área marcada en b). La colocalización de ambas proteínas fue poco frecuente (puntas de flecha en b'). La barra de escala en Dd representa 50 μm en A y D; la barra de escala en Bg representa 25 μm en B y la barra de escala en Cb representa 50 μm en C.

4.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO



4. RESULTADOS

en P150 (90 datx), y representamos con puntos todos los mRNAs que resultaron sobre-expresados o reprimidos cuando se compararon con los machos control en ambos conjuntos de datos (Figura 4.16, puntos azules pequeños). Casi todos los genes afectados por la pérdida de *Dmrt1* también se afectaron por la pérdida de *Sox9/8* (Figura 4.16).

Este hecho sugiere que tanto *Dmrt1* como *Sox9/8* actúan en la misma vía, aunque también existe la posibilidad de que esta coincidencia entre ambos patrones de expresión génica pueda ser un efecto secundario del cambio en el número relativo de tipos celulares en los testículos SC-*Sox9/8* DKO. Entre los genes sobre-expresados en ambos experimentos (cuadrante superior derecho en la Figura 4.16), encontramos 29 genes somáticos específicos del ovario, incluyendo genes promotores femeninos como *Foxl2*, *Wnt4*, *Rspo1*, *Fst*, *Fshr* (Figura 4.16, triángulos rojos). También, identificamos un conjunto de genes activados en los mutantes *Dmrt1* y reprimidos en mutantes *Sox9/8* (cuadrante superior izquierdo en la Figura 4.16), que puede ser consecuencia de 1) las diferencias de edad entre los dos conjuntos de muestras comparadas, 2) la eficiencia incompleta de la inactivación de *Sox9* en nuestro SC-*Sox9* KO condicional, o 3) la existencia de funciones adicionales para *Sox9/8* y/o *Dmrt1* en los testículos adultos.

Recientemente se ha demostrado que DMRT1 funciona protegiendo a las células de la gónada masculina de la transdiferenciación sexual dependiente del ácido retinoico (RA) y que este proceso podría inhibirse bloqueando la síntesis del RA intratubular en los testículos mutantes para *Dmrt1* (Minkina *et al.*, 2014). Al comparar el perfil de mRNA de los testículos SC-*Dmrt1* KO y SC-*Sox9/8* DKO, encontramos un conjunto de genes pertenecientes a la ruta de señalización del RA que muestran una variación de la expresión similar en ambos mutantes (Figura 4.16, puntos verdes). Como la expresión de *Dmrt1* está reducida en los testículos *Sox9/8* SC-DKO, nos planteamos la hipótesis de que la disminución de los niveles del RA en nuestros mutantes *SoxE* también debería afectar al proceso de transdiferenciación. Para comprobarlo, tratamos a los ratones adultos SC-DKO con el inhibidor de la retinaldehído deshidrogenasa WIN 18 446 justo cuando se detectaron las primeras células FOXL2 positivas. Encontramos una reducción de 3,5 veces en el número de células FOXL2 positivas por sección de cordón testicular en los ratones tratados con WIN 18 446 (1.80

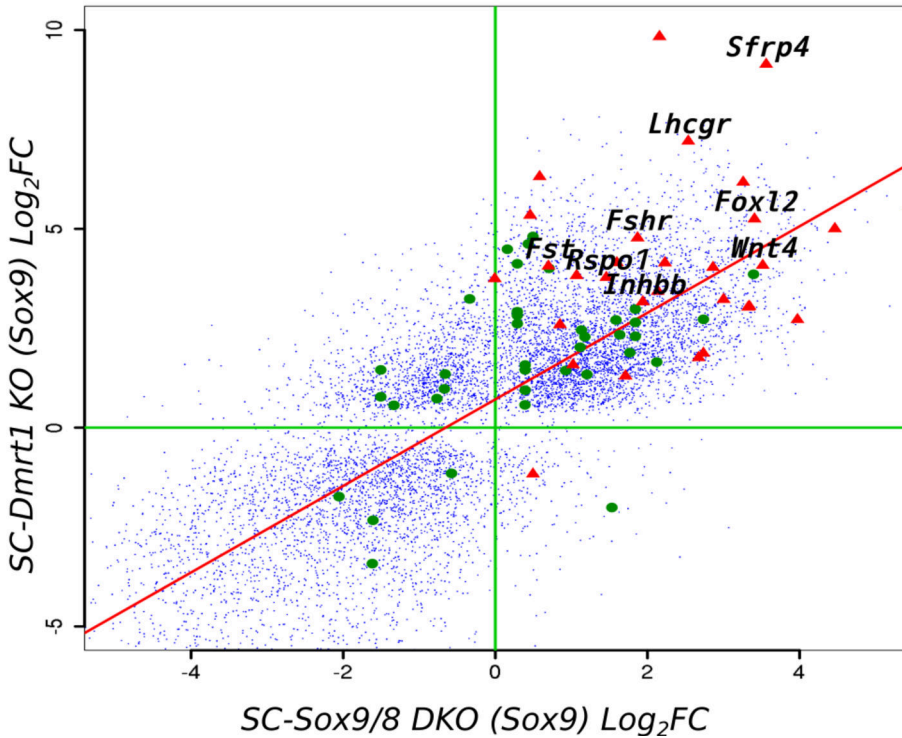


Figura 4.16: *Sox9* vs. *Dmrt1* *Sox9*: y *Dmrt1* actúan en la misma ruta durante la transdiferenciación de Sertoli-granulosa. Se muestra el diagrama de dispersión del Log_2 fold change que compara los datos del microarray de los testículos SC-*Dmrt1* KO en P28 generados por Zarkower (2011b) (acceso a GEO: GSE27261) con los datos del transcriptoma de nuestros mutantes SC-*Sox9/8* DKO en P150 (90 datx), incluyendo 8910 genes que muestran expresión diferencial significativa con respecto a los testículos controles tanto en los mutantes *Dmrt1* como en *Sox9/8* (puntos azules). Entre ellos, los puntos verdes representan 24 genes que pertenecen a la ruta de apoptosis mediada por ácido retinoico (RA) y a la ruta de señalización mediada por receptores del RA, según la base de datos *PathCards*. Los triángulos rojos muestran 29 genes somáticos específicos del ovario incluidos en la Figura 4.9 A. Se indican los nombres de algunos genes relevantes. La línea de regresión se muestra en rojo (ordenada en el origen = 0.7112, pendiente = 1.0883).

4. RESULTADOS

± 2.03), en comparación con los controles inyectados con DMSO (6.57 ± 3.52 ; $p < 0,001$; Figura 4.17. Por lo tanto, al igual que ocurría en los ratones *Dmrt1* SC-KO (Minkina *et al.*, 2014), el proceso de transdiferenciación de las células de Sertoli en células de la granulosa también parece inhibirse cuando se reducen los niveles de RA en nuestro modelo de estudio.

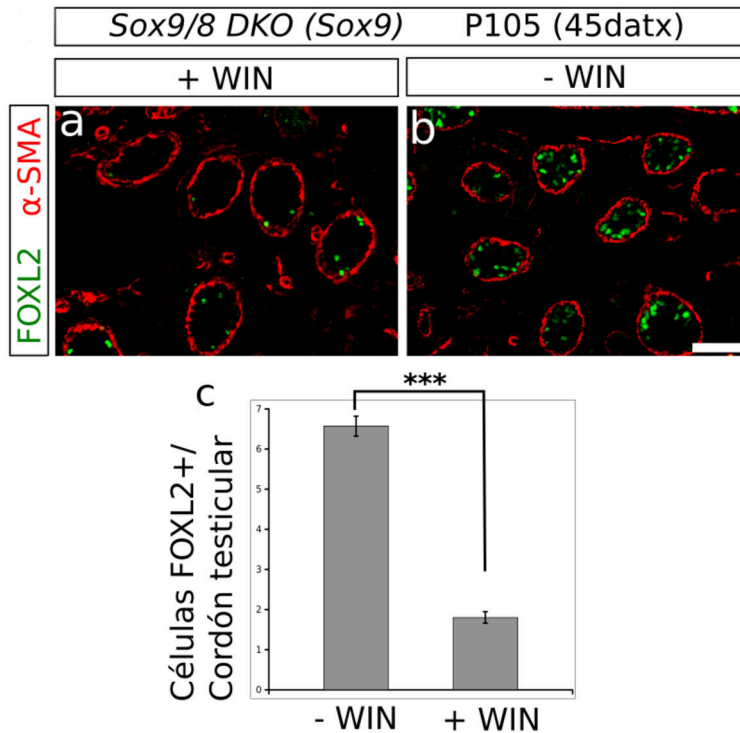


Figura 4.17: Efecto del tratamiento con WIN 18446 en la transdiferenciación Sertoli-granulosa de los testículos *Sox9/8*: SC-DKO: Las células FOXL2⁺ (fluorescencia verde) son más abundantes en los testículos mutantes no tratados (a) que en los testículos mutantes tratados (b). El número de células positivas por sección de cordón testicular fue 3,5 veces mayor en los ratones no tratados (c). La señal ACTA2 (fluorescencia roja) permite delinear los cordones testiculares en a y b. La barra de escala en b representa 100 μm en a y b.

4.1.6 SOX9 y SOX8 actúan como factores antiapoptóticos en las células de Sertoli adultas.

Coincidiendo con el final del tratamiento con TX, los testículos *Sox9/8* SC-DKO comienzan a degenerar progresivamente, como evidencia la contracción de los túbulos seminíferos. De hecho, los ratones con un fenotipo más severo alcanzan un grado extremo de involución tubular y se los túbulos se convierten en cordones testiculares acelulares. Una posible explicación para la pérdida de células somáticas tubulares es que la apoptosis está operando en estos testículos. El análisis de TUNEL reveló que las células apoptóticas se encuentran principalmente dentro de los túbulos o cordones testiculares, mostrando que las células intersticiales (en su mayoría células de Leydig) no están afectadas seriamente. El número de células TUNEL⁺, contadas en un área total de 11.55 mm², entre P90 (30 datx) y P120 (60 datx) en ambos mutantes SC-DKO (370 células para la línea *Wt1-CreERT2* y 488 células para la línea *Sox9-CreERT2*) fueron significativamente mayores que las encontradas en los testículos control tratados con TX (120 células; bondad de ajuste $p < 2.2 \times 10^{-16}$ en ambos casos; Figura 4.18 a-c). La abundancia de cuerpos apoptóticos presentes en P150 (90 datx) (Figura 4.18 d) documenta la muerte celular masiva que ha ocurrido durante las etapas anteriores en los ratones *Sox9/8* SC-DKO.

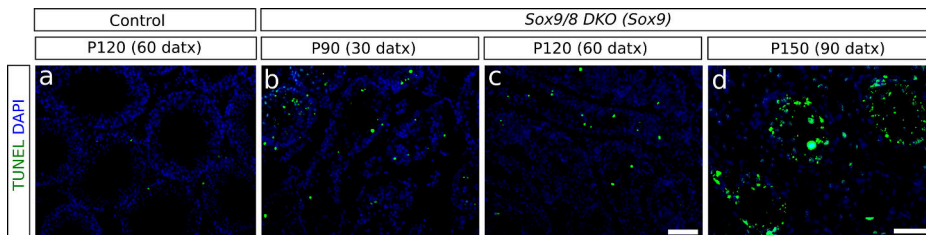


Figura 4.18: Apoptosis en SC-DKO: Incidencia de la apoptosis en los testículos *Sox9/8* SC-DKO. Tinción de TUNEL en secciones de testículos control tratados con TX (*Sox9^{f/f}; Sox8^{-/-}*) en P120 (60 datx) (a) y testículos *Sox9/8* SC-DKO en diferentes puntos (b-d). La barra de escala en (c) representa 100 μm para a-c; la barra de escala en d representa 50 μm

Para identificar los tipos celulares que están sufriendo apoptosis, combinamos la tinción TUNEL con inmunofluorescencia para varios marcadores moleculares. No observamos ninguna célula SOX9⁺ ni FOXL2⁺ que

4. RESULTADOS

fueran TUNEL⁺ en los testículos mutantes antes de P120 (60 datx) (Figura 4.19 a,c), pero en P150 (90 datx), encontramos que las células SOX9⁺ eran apoptóticas (Figura 4.19 b). En contraste, observamos células apoptóticas que expresaban WT1 ya en P90 (30 datx) (Figura 4.19 d), lo que indica que la apoptosis afecta principalmente a las células de Sertoli recombinantes en las que la *Sox9* ha desaparecido pero *Foxl2* aún no se ha activado. En conjunto, estos resultados sugieren que la regresión testicular en los mutantes *Sox9/8* ocurre en dos etapas diferentes. Durante los dos primeros meses después del inicio de la administración de TX, tanto las células de Sertoli no recombinantes (SOX9⁺) como las células transdiferenciadas (FOXL2⁺) permanecen vivas, mientras que las células recombinantes pero aún no transdiferenciadas (SOX9⁻, WT1⁺) sufren apoptosis. En la segunda etapa (P180 y ratones más viejos), la apoptosis masiva afecta a todos los tipos de células, incluyendo las células de Sertoli restantes y las células tipo granulosa.

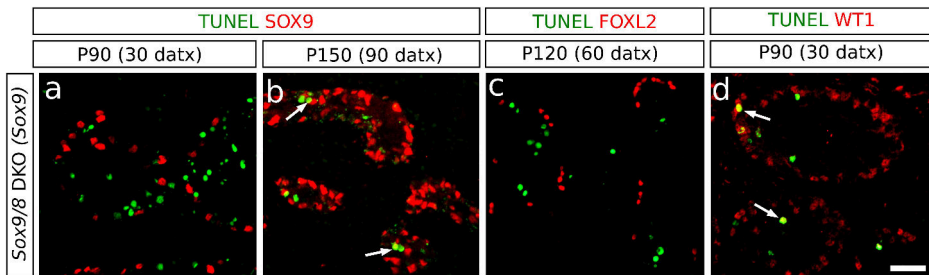


Figura 4.19: Apoptosis en SC-DKO: Identificación de las células apoptóticas en los testículos *Sox9/8* SC-DKO mediante doble inmunofluorescencia para TUNEL y tres marcadores moleculares: SOX9 [a, (P90 (30datx)) y b, (P150 (90 datx))], FOXL2 (c, P120 (60 datx)) y WT1 (d, P90 (30 datx)). Las flechas en b y d marcan las células que coexpresan las dos proteínas. La barra de escala en d representa 50 μ m en a-d

4.2 Función de miR-17-92 en el testículo

4.2.1 Generación de ratones mutantes *miR-17-92* específicamente en células de Sertoli

Para confirmar que el transgén *Amh-Cre* lleva a cabo su función específicamente en las células de Sertoli, generamos ratones que portaban ambos, el alelo *R26R-LacZ* y alelo *Amh-Cre* e hicimos una tinción para la β -galactosidasa en testículos embrionarios de E15.5. Pudimos observar que la recombinación mediada por CRE del alelo *R26R-LacZ* ocurría exclusivamente en las SCs (Figura 4.20 A). Obtuvimos resultados similares en los testículos mutantes (*Amh-Cre;miR-17-92^{fllox/fllox};R26R-LacZ*) a los 2 meses (P60) (Figura 4.20 B). De acuerdo con estas observaciones, detectamos un producto de PCR de 441 pb específico del alelo *miR-17-92^{fllox}* delecionado en los testículos de ratones *Amh-Cre;miR-17-92^{fllox/fllox}* (a partir de ahora denominados SC-*miR-17-92* KO), pero ausente en testículos control y en otros tejidos adultos SC-*miR-17-92* KO (Figura 4.20 C). Consistente con estos datos, la RT-PCR cuantitativa de testículos embrionarios control y SC-*miR-17-92* KO en E15.5, mostró una reducción significativa de alrededor del 30 % de los niveles expresión de *miR-17-92 host gene* (*miR-17-92hg*) en los testes mutantes (n = 3; p = 0.041, *t*-student de dos colas; Figura 4.20 D).

4.2.2 Las células somáticas y las células germinales son aparentemente normales en los testículos de SC-*miR-17-92* KO.

Fenotipo testicular de los ratones SC-*miR-17-92* KO.

Los ratones SC-*miR-17-92* KO eran fértiles y proporcionaban camadas con un tamaño similar a las de los controles. En P60, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la masa testicular de los SC-*miR-17-92* KO y los controles (n = 8; control 110 ± 17 mg; mutante 104 ± 16 mg; p = 0.48; *t*-student de dos colas). A nivel histológico, los testículos mutantes de 2 meses de edad eran semejantes a los controles, de hecho mostraban túbulos seminíferos de tamaño similar que completaban

4. RESULTADOS

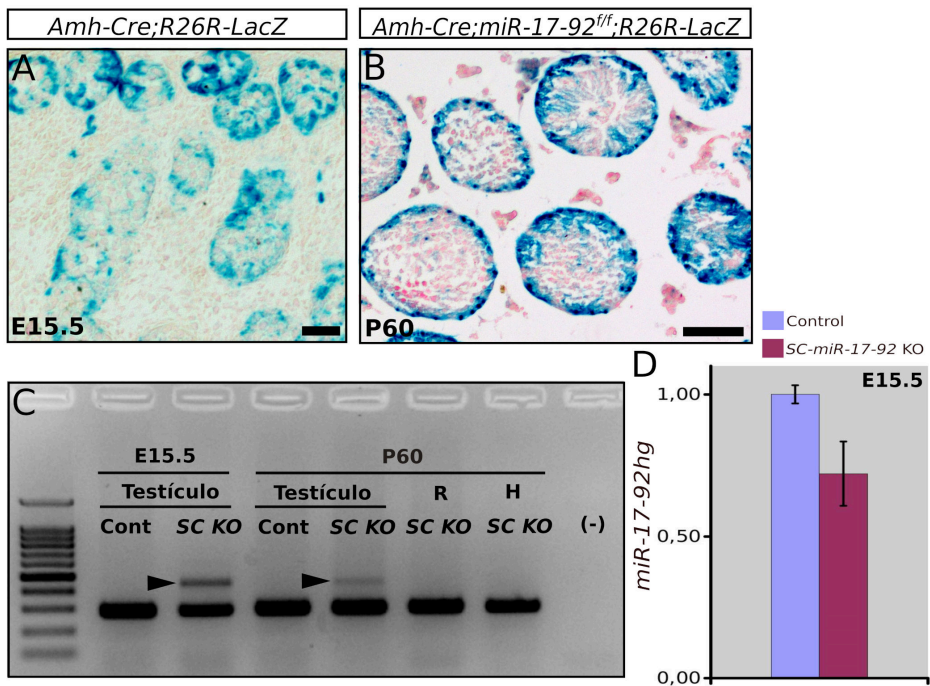


Figura 4.20: Mutantes *miR-17-92* específicos de SC. Confirmación de la generación de ratones mutantes *miR-17-92* específicos de SC. La tinción para la β -galactosidasa en testículos muestra la recombinación mediada por CRE del alelo *R26R-LacZ* en células de Sertoli en E15.5 (**A**) y P60 (**B**). (**C**) El genotipado mediante PCR indica que la banda de 441 pb específica para el alelo *miR-17-92^{flox}* deletado (puntas de flecha) aparece en los testículos de ratones SC-KO, pero no en los testículos de los machos control ni en otros tejidos (R, riñón; H, hígado). (**D**) RT-PCR cuantitativa para determinar los niveles de expresión de *miR-17-92hg* en los testículos control y SC-*miR-17-92* KO en E15.5. Las barras de escala representan 20 μ m en A y 100 μ m en B.

4.2. FUNCIÓN DE MIR-17-92 EN EL TESTÍCULO

el ciclo espermatogénico (Figura 4.21 Ba y Be). De acuerdo con las observaciones anteriores, los epidídimos estaban llenos de espermatozoides y los recuentos de esperma por epidídimo no mostraron diferencias entre ambas condiciones ($n = 5$; control $44.7 \times 10^6 \pm 11.9 \times 10^6$; mutante $46.6 \times 10^6 \pm 14.5 \times 10^6$; $p = 0.82$, *t*-student de dos colas; Figura 4.21 C). La misma situación persistió en los ratones mutantes con un año de edad: 1) eran fértiles, 2) no mostraron diferencias en la masa del testículo en comparación con los controles ($n = 5$; control 120 ± 16 mg; mutante 115 ± 19 mg; $p = 0.69$, *t*-student de dos colas; Figura 4.21 A), 3) sus testículos mostraban una espermatogénesis normal (Figura 4.21 Bg), los epidídimos estaban llenos de espermatozoides (Figura 4.21 Bh), y sus recuentos de espermatozoides por epidídimo eran similares a los de los controles ($n = 5$; control $50.3 \times 10^6 \pm 11.8 \times 10^6$; mutante $53.5 \times 10^6 \pm 0.91 \times 10^6$; $p = 0.62$, *t*-student de dos colas; Figura 4.21 C).

Estado funcional de las células somáticas y germinales de los testículos SC-*miR-17-92* KO

A continuación, estudiamos la expresión de varios marcadores somáticos y germinales por inmunofluorescencia. SOX9 y WT1, dos factores de transcripción expresados en las células de Sertoli adultas y necesarios para la función y el mantenimiento de los testículos (Wang *et al.*, 2013b; Barrionuevo *et al.*, 2016), presentaron un patrón de expresión similar tanto en las SC de los testículos control como en las SC de los testículos mutantes SC-*miR-17-92* KO (Figura 4.22 A). A continuación, analizamos la expresión de PCNA, un marcador de espermatogonias mitóticas y de espermatoцитos en zigotene y paquitene temprana (Chapman & Wolgemuth, 1994) y de la proteína de recombinación meiótica, DMC1, que se expresa en los espermatoцитos tempranos (leptotene-paquitene) (Yoshida *et al.*, 1998), y no observamos diferencias en el patrón de expresión entre los testículos mutantes y controles en P60 (Figura 4.22 B). Además, LAMININA, un componente de la membrana basal (Richardson *et al.*, 1995), y α -smooth muscle actin 2 (ACTA2), un marcador de células mioideas peritubulares y fibras musculares lisas, mostraron una expresión similar en las dos condiciones analizadas (Figura 4.22 C). De igual forma, el patrón de expresión de P450scc, un citocromo esteroideogénico expresado

4. RESULTADOS

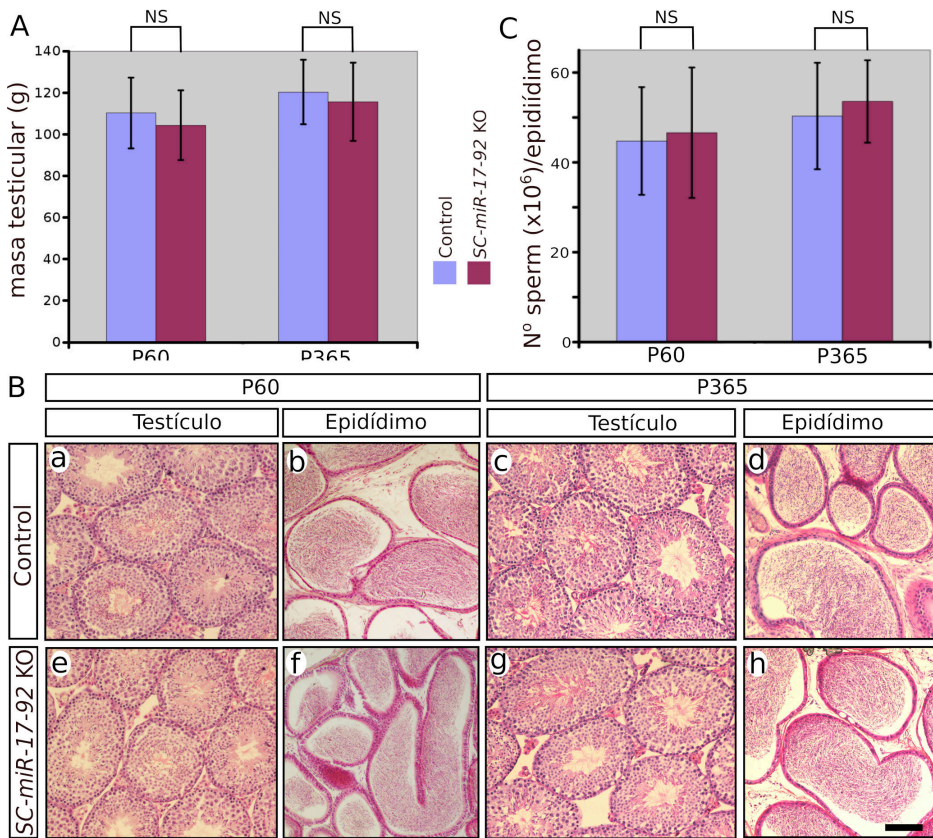


Figura 4.21: Fenotipo testicular de los machos SC-miR-17-92 KO en P60 y P365: La masa testicular (A), las características histológicas (B) y los recuentos de espermatozoides (C) fueron similares tanto en los machos mutantes como en los controles. La barra de escala mostrada en B representa 100 μm para todas las imágenes en B.

por las células de Leydig, también fue similar tanto en los testículos SC-*miR-17-92* KO como en los controles (Figura 4.22 D).

Además, CLAUDINA 11 (*Cldn11*), un componente fundamental de las uniones estrechas que forman la BTB, no mostró un patrón de expresión diferente entre mutantes y controles (Figura 4.23 a y d). Consistentemente, la inyección con el trazador de biotina mostró que la BTB en los machos mutantes era impermeable, al igual que en los testículos control (Figura 4.23 b y e).

Finalmente, mediante TUNEL, pudimos observar que no hubo ningún aumento en la frecuencia de células apoptóticas en los testículos SC-*miR-17-92* KO en comparación con los controles ($n = 3$; control: 14.65 ± 10.07 células apoptóticas/mm²; mutante: 13.96 ± 8.87 células apoptóticas/mm²; $p = 0.23$, *t*-student de dos colas; Figura 4.24 a-c).

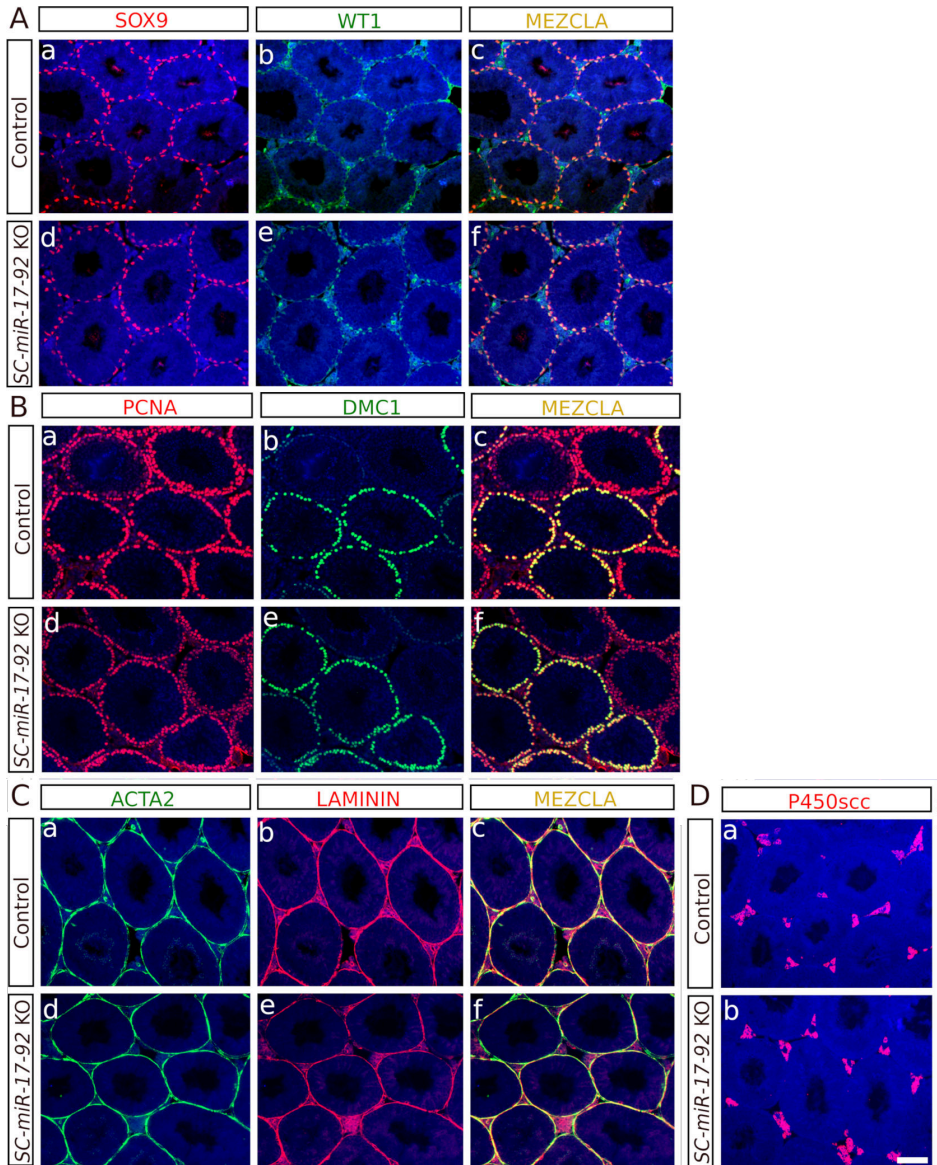
En resumen, estos resultados muestran que los testículos mantienen su función después de la ablación específica de *miR-17-92* en las células de Sertoli.

4.2.3 El transcriptoma testicular de los ratones SC-*miR-17-92* KO está alterado

Realizamos experimentos de RNA-seq en testículos adultos de tres ratones macho SC-*miR-17-92* KO y tres controles en P60. Las diferencias entre los perfiles de expresión de estas muestras se examinaron mediante un análisis de *clusterización* jerárquica (Figura 4.25). Como se observa, las muestras replicadas de la misma condición se agrupan indicando que

Figura 4.22 : Marcadores somáticos y germinales: Expresión de marcadores somáticos y germinales en los testículos SC-*miR-17-92* KO. No se observaron diferencias entre los testículos mutantes y controles en el patrón de expresión de marcadores específicos de: las células de Sertoli (SOX9 y WT1; **A** a-f), las células germinales (PCNA y DMC1; **B** a-f), las células mioides peritubulares (ACTA2; **C** a y d) y la membrana basal de los túbulos seminíferos (LAMININA; **C** b y e; **C** c y f muestran imágenes combinadas), y las células de Leydig (P450scc; **D** a y b). La barra de escala mostrada en Db representa 100 μm para todas las imágenes.

4. RESULTADOS



4.2. FUNCIÓN DE MIR-17-92 EN EL TESTÍCULO

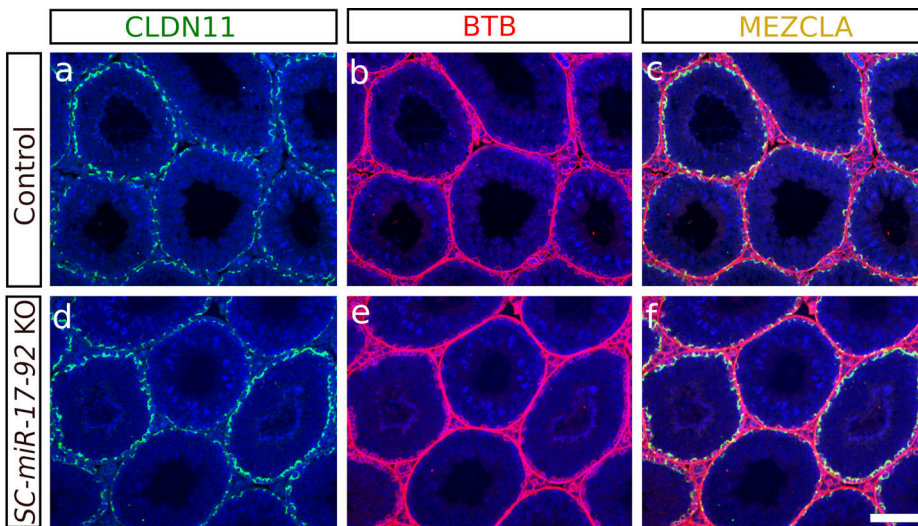


Figura 4.23: Estudio de la BTB: Estudio de la BTB en los testículos SC-*miR-17-92* KO. Tanto el patrón de expresión de CLAUDINA 11 (a y d) como la función BTB (b y e) son normales en los testículos mutantes en comparación con los controles, (c) imágenes combinadas a+b, (f) imágenes combinadas d+e. La barra de escala mostrada en f representa 100 μm para todas las imágenes.

4. RESULTADOS

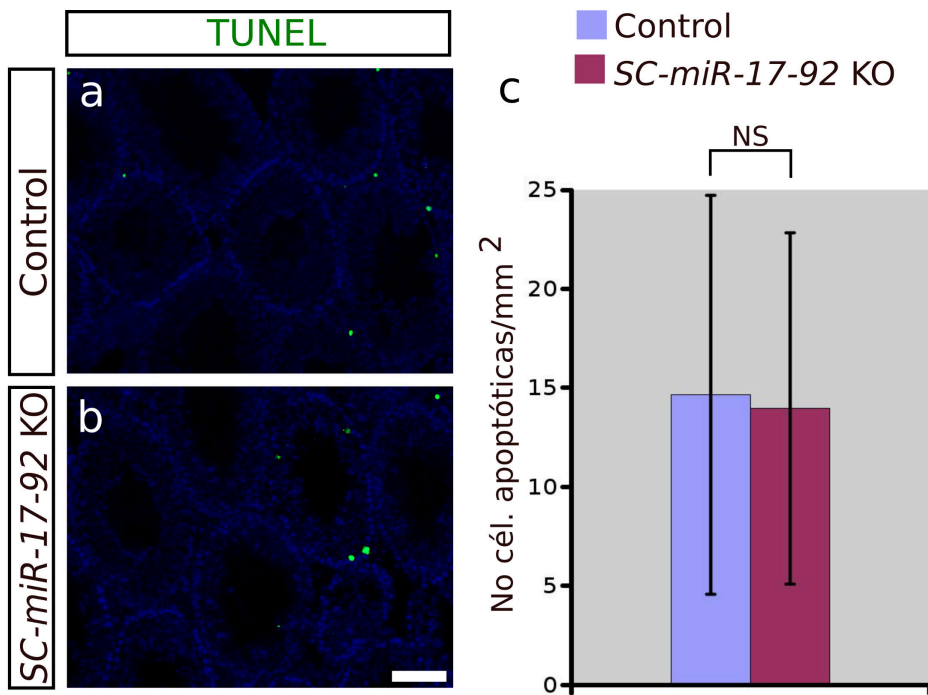


Figura 4.24: Estudio de la apoptosis: Análisis de la apoptosis en los testículos SC-*miR-17-92* KO. La incidencia de apoptosis fue similar tanto en los testículos mutantes (a) como en los controles (b), además, los recuentos de células no mostraron diferencias significativas entre ambas condiciones (c). La barra de escala en b representa 100 μm para a y b.

4.2. FUNCIÓN DE MIR-17-92 EN EL TESTÍCULO

el transcriptoma de los testículos se altera de manera significativa y consistente cuando se elimina *miR-17-92* en las SC.

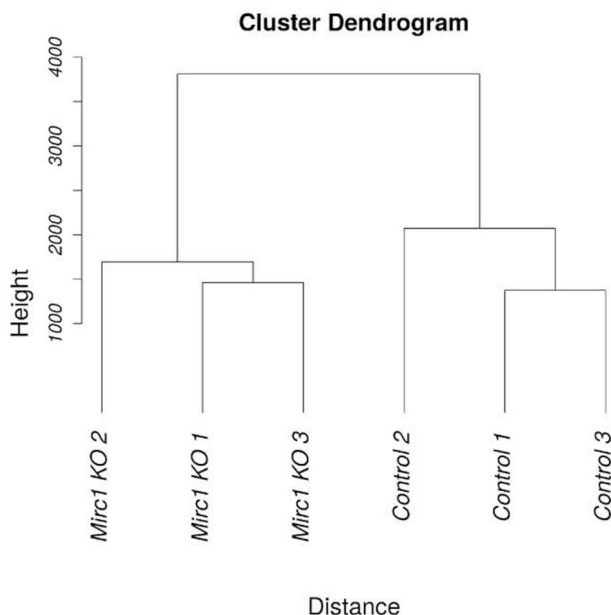


Figura 4.25: Clusterización en SC-*miR-17-92* KO y controles: El análisis jerárquico de *clusterización* muestra la agrupación de las réplicas de ratones SC-*miR-17-92* KO, por un lado, y de controles, por otro.

Para confirmar este hecho, comprobamos si había genes expresados diferencialmente (DE) al comparar las dos condiciones experimentales. Así, 809 genes desmostraron estar desregulados a un valor de P ajustado (FDR) <0.01 (418 sobre-expresados y 391 sub-expresados). El plot de dispersión de expresión diferencial mostró que la gran mayoría de los genes con expresión diferencial tenían una variación menor del doble o la mitad de su expresión en controles, indicando que a pesar de mostrar una desregulación reproducible de muchos genes, la magnitud del cambio fue generalmente moderada (Figura 4.26).

El análisis de la ontología génica (GO) de los genes que mostraron expresión diferencial reveló un enriquecimiento significativo (P aj. <0.05) en términos relacionados con las funciones testiculares normales, incluyendo

4. RESULTADOS

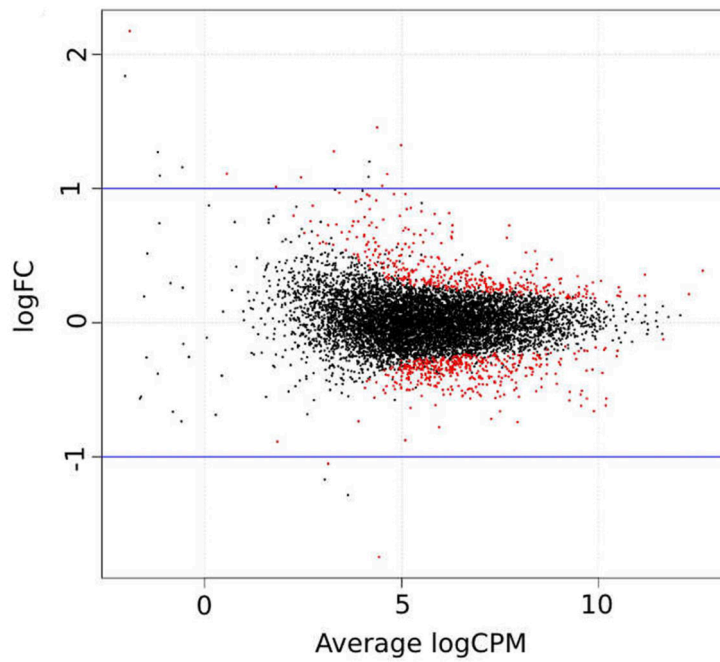


Figura 4.26: Gráfico de dispersión de DE: El gráfico de dispersión de la expresión diferencial mostró que la gran mayoría de los genes desregulados presentan un cambio en sus niveles de expresión menor a una unidad de \log_2 (\log_2FC).

4.2. FUNCIÓN DE MIR-17-92 EN EL TESTÍCULO

la espermatogénesis, el ciclo celular meiótico, la segregación cromosómica, la adhesión célula-célula, la proyección celular, y la reparación del DNA, entre otros (Figura 4.27).

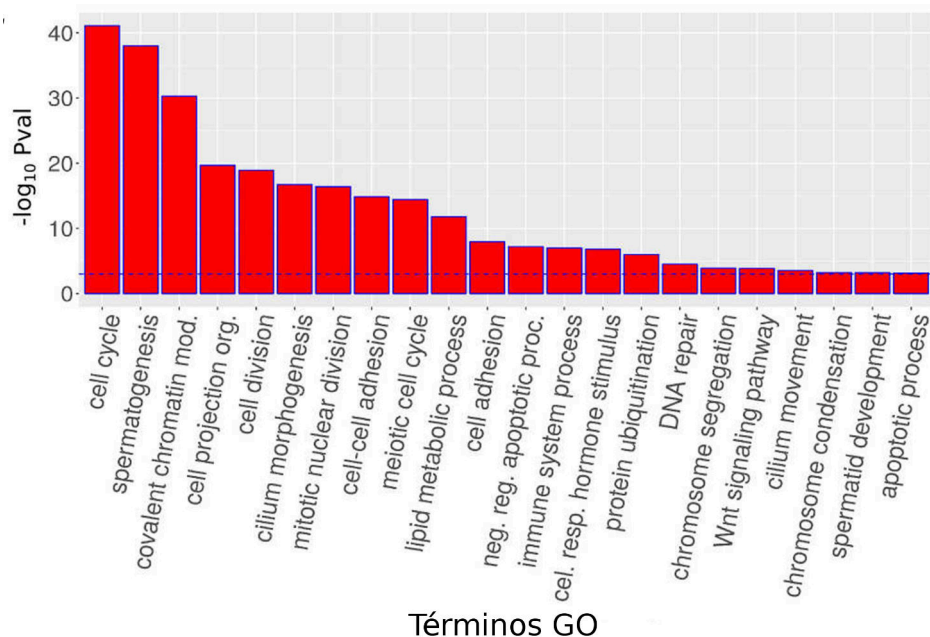


Figura 4.27: Análisis GO de ratones SC-miR-17-92 KO: El análisis GO de los genes desregulados en ratones SC-miR-17-92 KO reveló un enriquecimiento significativo (P adj. <0.05 , línea azul discontinua) en términos asociados a funciones testiculares normales.

Curiosamente, aunque *miR-17-92* fue eliminado específicamente en las SC, varios términos GO hacen referencia a procesos que normalmente ocurren en las células germinales (por ejemplo, desarrollo espermático y ciclo celular meiótico), lo que sugiere que la espermatogénesis también estaba afectada en los ratones mutantes. Esta observación es consistente con la noción bien conocida de que la alteración de la funcionalidad de las SCs está frecuentemente asociada a un fallo en la maduración de las células germinales (Barrionuevo *et al.*, 2016; Griswold, 1998; Chen *et al.*, 2015).

Así, utilizamos los transcriptomas recientemente publicados de las cin-

4. RESULTADOS

co poblaciones principales de células del testículo (Sertoli, espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides) implicadas en la espermatogénesis (Soumillon *et al.*, 2013) para desarrollar un algoritmo que asigne cada uno de los genes expresados diferencialmente en los testículos SC-*miR-17-92* KO a tipos específicos de células. Primero, buscamos genes expresados diferencialmente realizando comparaciones por pares de los transcriptomas de los distintos tipos de células del estudio de Soumillon *et al.* (2013). Posteriormente asignamos los genes expresados diferencialmente de nuestro SC-*miR-17-92* KO al tipo específico de célula en el que mostraban el nivel de expresión más alto en estos transcriptomas.

La fiabilidad de estas asignaciones de genes a tipos celulares concretos fue probada buscando entre ellos marcadores genéticos específicos conocidos de cada tipo celular. De forma consistente, los principales marcadores celulares específicos fueron asignados al tipo correcto de célula: Sertoli (*Wt1, Cldn11, Cdh2, Sox8, Gata1, Gata4*), espermatogonía (*Gdnf, Cd9, Nanos2, Nanos3, Thy1, Bcl6, Gfra1, Epcam*) espermatozoides (*Sycp1, Sycp2, Sycp3, Rad51, Spo11, Syce1, Tex12, Eme1*), espermatidas (*Prm1, Rsb1, Rsb1nl, Tnp1, Tnp2, Theg, Nme8, Txnd8*), lo que indica que nuestro enfoque refleja claramente los patrones de expresión específicos de cada tipo celular.

El diagrama de circos en la Figura 4.28 muestra la distribución de los genes DE en testículos SC-*miR-17-92* KO entre los diferentes tipos de células. Cabe señalar que tanto los genes sobre-expresados como los sub-expresados no están distribuidos aleatoriamente entre los diferentes tipos de células, sino que la mayoría de los genes sobre-expresados pertenecen a espermatidas, mientras que la mayoría de los genes sub-expresados pertenecen a todos los demás tipos de células, incluidas las células de Sertoli. En este tipo de células, encontramos 55 genes desregulados, 34 sub-expresados y 21 sobre-expresados.

El análisis GO de estos genes reveló una sobre-representación en categorías relacionadas con la adhesión célula-célula y el retículo endoplasmático (Figura 4.29 A). Asimismo, el análisis GO de los genes desregulados en los otros tipos de células mostró enriquecimiento en términos relacionados con 1) las uniones celulares y el ciclo celular para las espermatidas, 2) el ciclo celular meiótico, la modificación covalente de la cromatina y la reparación del DNA para los espermatocitos, y 3) la morfogénesis del

4.2. FUNCIÓN DE MIR-17-92 EN EL TESTÍCULO

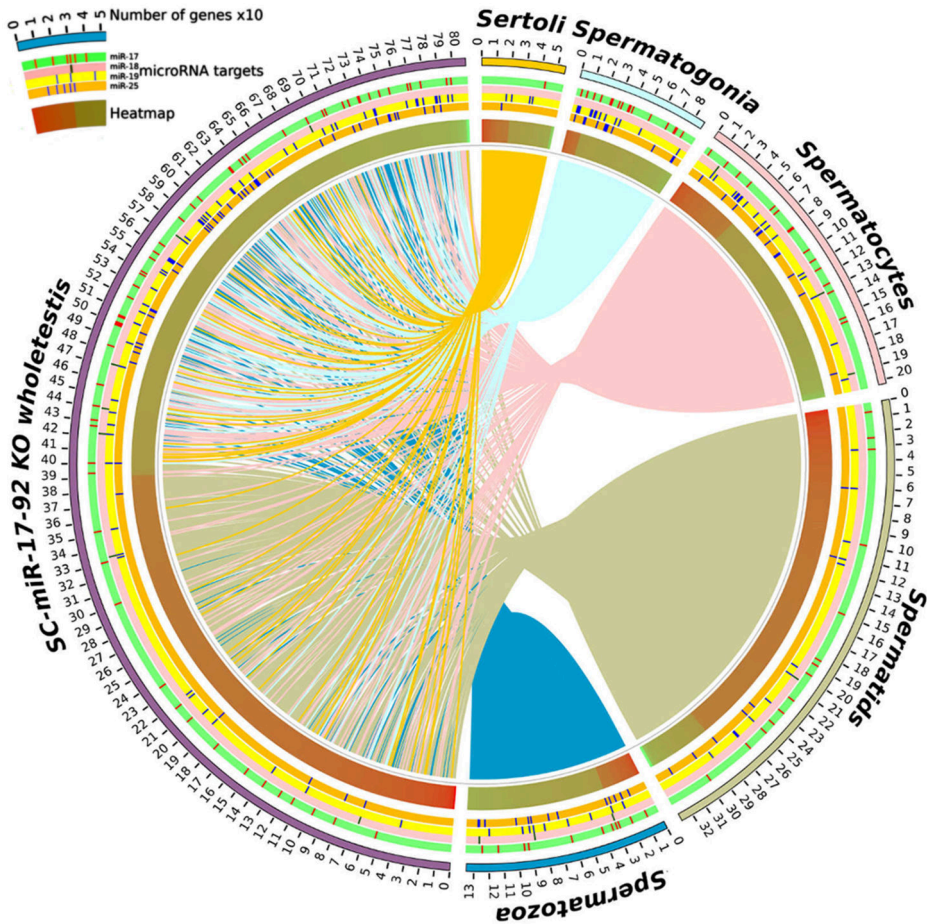


Figura 4.28: Asignación de genes a tipos celulares: Los genes expresados diferencialmente fueron asignados a los cinco tipos de células principales en los testículos de los machos SC-*miR-17-92* KO. El color en la pista *Heatmap* muestra el nivel de expresión relativo en los testículos SC-*miR-17-92* KO respecto a los testículos de control. El rojo indica genes sobre-expresados y el verde genes sub-expresados.

4. RESULTADOS

cilio y el desarrollo espermático para las espermátides (Figura 4.29 B-D), todos ellos referidos a procesos que normalmente ocurren en estos tipos de células durante la espermatogénesis y la espermiogénesis.

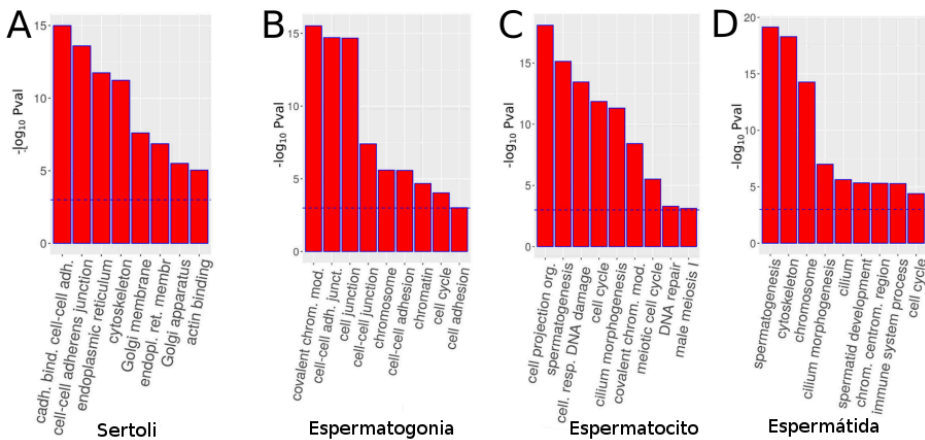


Figura 4.29: Enriquecimiento en términos GO: Los genes asignados a los diferentes tipos de células parecen pertenecer a términos GO normalmente relacionados con el tipo de célula al que han sido asignados según el algoritmo descrito. ($P_{aj.} < 0.05$, línea de puntos azul).

Los miRNAs individuales incluidos en el clúster *miR-17-92* pueden agruparse en 4 familias basadas en las secuencias de sus semillas, que son las regiones más importantes para la selección de dianas. Por lo tanto, buscamos genes diana que estuviesen desregulados en nuestro transcriptoma de testículos SC-*miR-17-92* KO, y encontramos genes diana para cada familia de semillas. Sin embargo, éstos no estaban enriquecidos en genes sobre-expresados ni estaban localizados preferentemente en la lista específica de genes desregulados en SC (Figura 4.28).

4.3 *miR-106b-25* en la función testicular

4.3.1 La delección del clúster *miR-106b-25* causa oligozoospermia en los ratones

Como se ha comentado anteriormente, el clúster de miRNAs *miR-17-92* tiene, tanto en ratón como en humanos, dos clústers parálogos, *miR-106a-363* y *miR-106b-25*. Los clústers *MirC1* and *MirC3* tienen un patrón de expresión similar en todos los tejidos de ratón adulto analizados. Por el contrario, el clúster *MirC2* no se ha detectado en ningún tejido de ratón adulto donde se ha analizado su expresión (Ventura *et al.*, 2008). En el testículo, varios estudios han mostrado que miembros de los clústers *miR-17-92* y *miR-106b-25* se expresan en células primordiales geminales (PGCs) y en espermatogonias. En este último tipo celular muestran una expresión alta que va disminuyendo a medida que se inicia la meiosis (Tong *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2013). De acuerdo con esta expresión, la inactivación de *miR-17-92*, bien en testículo adulto (Xie *et al.*, 2016), o bien en células germinales específicamente (Tong *et al.*, 2012), produce defectos en la espermatogénesis. Por el contrario, no se ha descrito ninguna alteración para ratones en los que el clúster *miR-106b-25* está delecionado (Ventura *et al.*, 2008). Concretamente, en el caso del desarrollo y función testicular, puede deberse a que no se han estudiado en detalle estos procesos, ya que los ratones son fértiles. Motivados por todas estas observaciones, decidimos hacer un estudio minucioso de la función testicular en los ratones *miR-106b-25*^{-/-}.

Los ratones *miR-106b-25*^{-/-} tienen alteraciones en la espermatogénesis.

El análisis morfológico e histológico de los testículos embrionarios y postnatales tempranos de los ratones *miR-106b-25*^{-/-} no reveló ninguna diferencia con respecto a los testículos controles. Sin embargo, a los dos meses (P60), los ratones mutantes presentaron una reducción significativa en la masa testicular de alrededor del 30 % (n= 9; control: 110 ± 17 g; mutante: 81.3 ± 5.7 g; *t*-student de dos colas, p = 0.00073; Figura 4.30 A). Además de esta reducción de peso, el recuento de espermatozoides por epidídimo

4. RESULTADOS

reveló una reducción estadísticamente significativa de alrededor del 40 % en los ratones mutantes ($n=7$; control: $44.7 \times 10^6 \pm 11.9 \times 10^6$ espermatozoides por epidídimo; mutante $28.6 \times 10^6 \pm 7.3 \times 10^6$ espermatozoides por epidídimo; t -student de dos colas, $p = 0.0049$; Figura: 4.30 B). A pesar de estas diferencias, los ratones mutantes son completamente fértiles, produciendo camadas similares a las de los ratones controles.

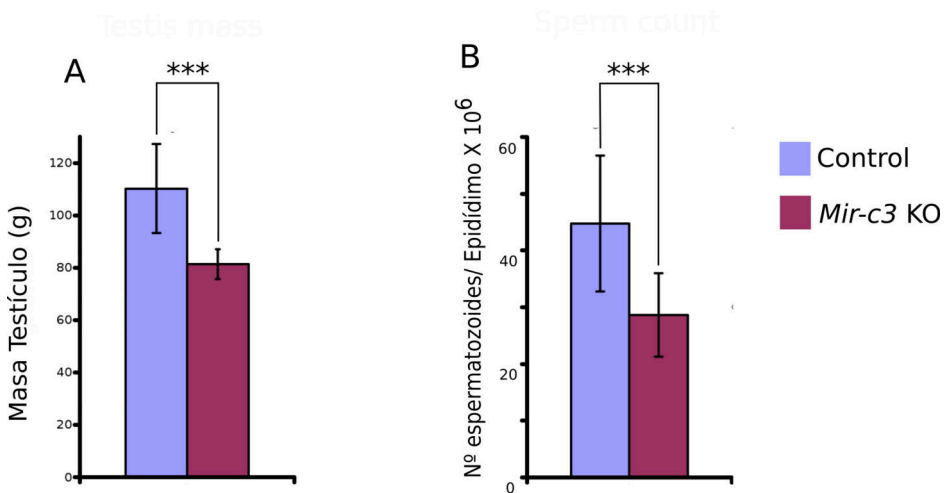


Figura 4.30: Análisis morfológico de los testículos *miR-106b-25*^{-/-}: (A) Comparación de la masa testicular y (B) del recuento de espermatozoides por epidídimo entre ratones controles y *miR-106b-25*^{-/-} (*Mir-C3* KO).

Para estudiar el fenotipo testicular a nivel histológico utilizamos el **índice de Johnsen**, un método estándar para evaluar la espermatogénesis. En este sistema se clasifican los túbulos seminíferos de acuerdo a su aspecto. A un túbulo normal con espermatozoides en su interior se le asigna una puntuación de 10, mientras que a los túbulos formados únicamente por células de Sertoli se le da una puntuación de 0. Contamos más de 100 túbulos en 3 testículos de cada condición y obtuvimos un índice de Johnsen medio de 9.2 ± 0.76 para los testículos controles mientras que para los testículos *miR-106b-25*^{-/-} obtuvimos un índice de Johnsen medio de 7.5 ± 0.92 ($n = 3$; t -student de dos colas, $p < 0.0001$). En los mutantes, observamos algunos túbulos degenerados a los que les correspondía un índice de Johnsen de 4, situación que no detectamos en los testículos con-

troles. Estos resultados indican que en los ratones mutantes para el clúster *miR-106b-25* hay un cierto número de túbulos seminíferos en los que la espermatogénesis parece estar afectada, aunque también existe un gran número de túbulos donde la espermatogénesis progresa con normalidad (Figura 4.31).

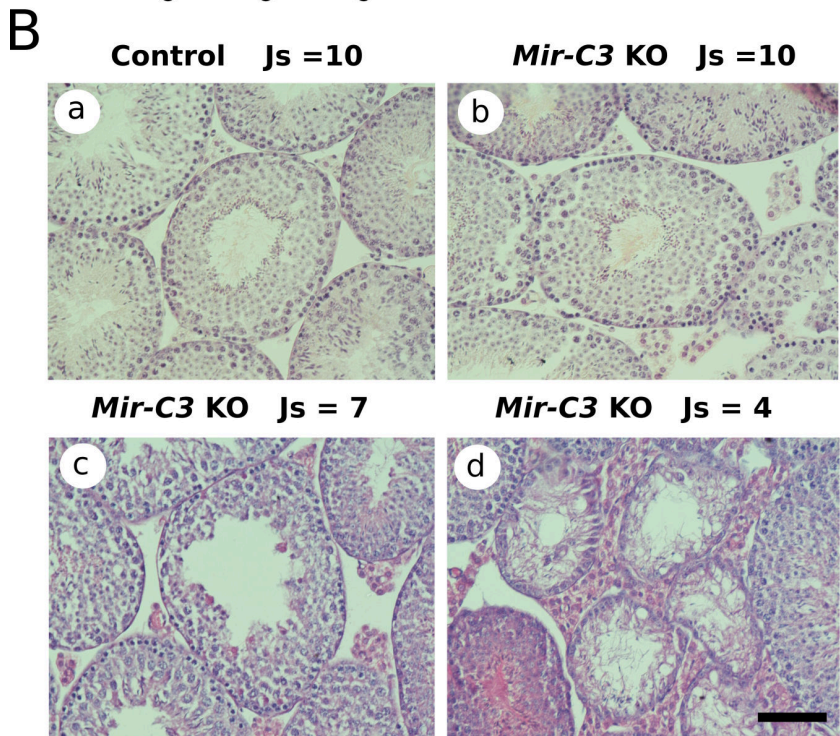
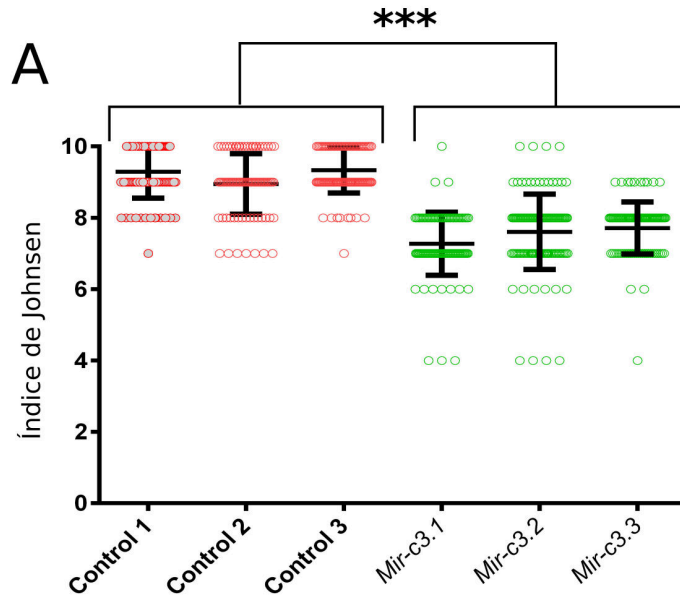
Debido a la alteración en la espermatogénesis que observamos en los testículos mutantes, decidimos estudiar la expresión de *Dmc1*, un marcador de espermátocitos en leptotene, cigotene y paquitene, que por tanto se expresa sólo en túbulos en los estadios espermatogénicos VII-IX (Yoshida *et al.*, 1998). Tanto en controles como en mutantes encontramos un patrón de expresión similar, con túbulos positivos y negativos para DMC1 (Figura 4.32 a y b). A pesar de esto, cuando calculamos el porcentaje de túbulos positivos para DMC1 en ambas condiciones, observamos que éste era el doble en los testículos mutantes para *miR-106b-25* que en los controles (n= 5; control: 21 %; mutante: 34 % ; chi-cuadrado, p = 0.0001; Figura 4.32 c).

Algunos tipos de alteraciones en el ciclo espermatogénico pueden estar asociados a un aumento en el número de células apoptóticas (Gunes *et al.*, 2015). Debido a esto, decidimos realizar un ensayo de apoptosis mediante la técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) en testículos control y mutantes. Observamos que en los testículos mutantes el número de células apoptóticas era aproximadamente el doble (n= 6; control: 9.3 ± 5.8 células por micrografía 10X (0.4 mm^2); mutante: 15.1 ± 7.5 células por micrografía 10X (0.4 mm^2); *t*-student de dos colas, p = 1.16×10^{-11} ; Figura 4.33)

Para identificar que tipos celulares estaban muriendo en los rato-

Figura 4.31 : Fenotipo testicular de ratones *Mir-C3* KO: (A) Comparación del índice de Johnsen entre testículos controles y *miR-106b-25*^{-/-} (*Mir-C3* KO). (B) Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina. En los testículos controles la mayoría de los túbulos seminíferos tenían un índice de Johnsen (Js) de 10 (a). En cambio, en los testículos mutantes para *miR-106b-25*, se observaron algunos túbulos con un índice de Johnsen de 10 (b), un gran número con un índice de Johnsen de 7 (c), y unos pocos con un índice de Johnsen de 4 (d). La barra de escala en Bd representa 75 μm para todas las micrografías de B.

4. RESULTADOS



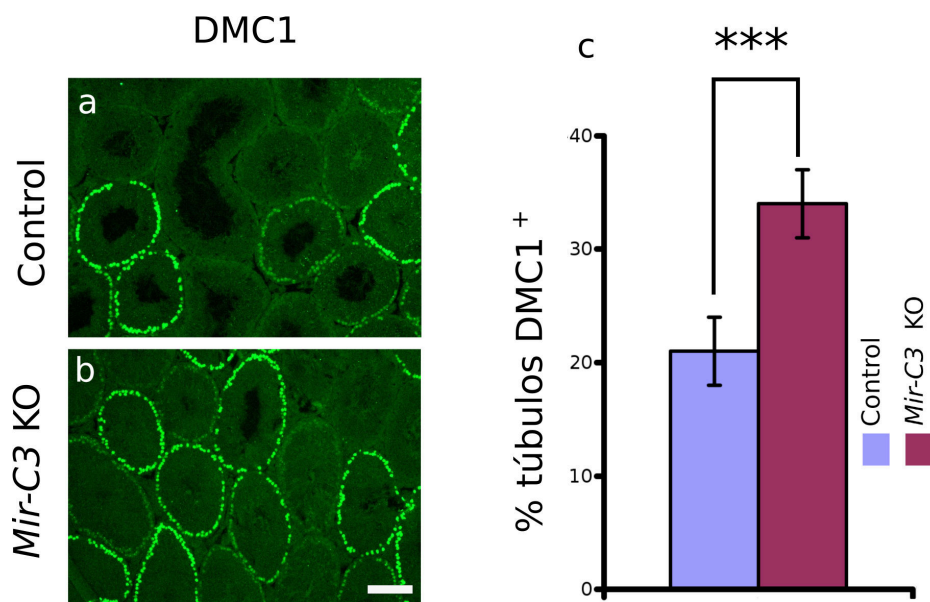


Figura 4.32: Espermatogénesis en ratones *miR-106b-25*^{-/-}: Inmunofluorescencia para DMC1 en testículos control (a) y testículos *miR-106b-25*^{-/-} (*Mir-C3* KO) (b). (c) Comparación del porcentaje de túbulos positivos para DMC1 en testículos controles y mutantes (*Mir-C3* KO). La barra de escala en b representa 150 μ m para a y b.

nes mutantes *miR-106b-25*, realizamos doble inmunofluorescencia para DMC1 y TUNEL. Observamos que la mayoría de las células positivas para TUNEL también eran positivas para DMC1, aunque en este último caso la intensidad de la fluorescencia era débil (Figura 4.34). Esto indica que en los túbulos seminíferos *miR-106b-25*^{-/-}, las células que están muriendo son principalmente espermatocitos en el estadio de paquitene.

El fenotipo testicular que presentan los ratones *miR-106b-25*^{-/-} puede deberse a defectos endocrinos primarios del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, que dan lugar a diferentes formas de hipogonadismo (El Meliegy *et al.*, 2018). Una característica común a estos síndromes es que los individuos poseen niveles bajos de testosterona sérica (Fraietta *et al.*, 2013). Debido a esto, decidimos medir los niveles de testosterona en el suero procedente de ratones controles y mutantes. No encontramos

4. RESULTADOS

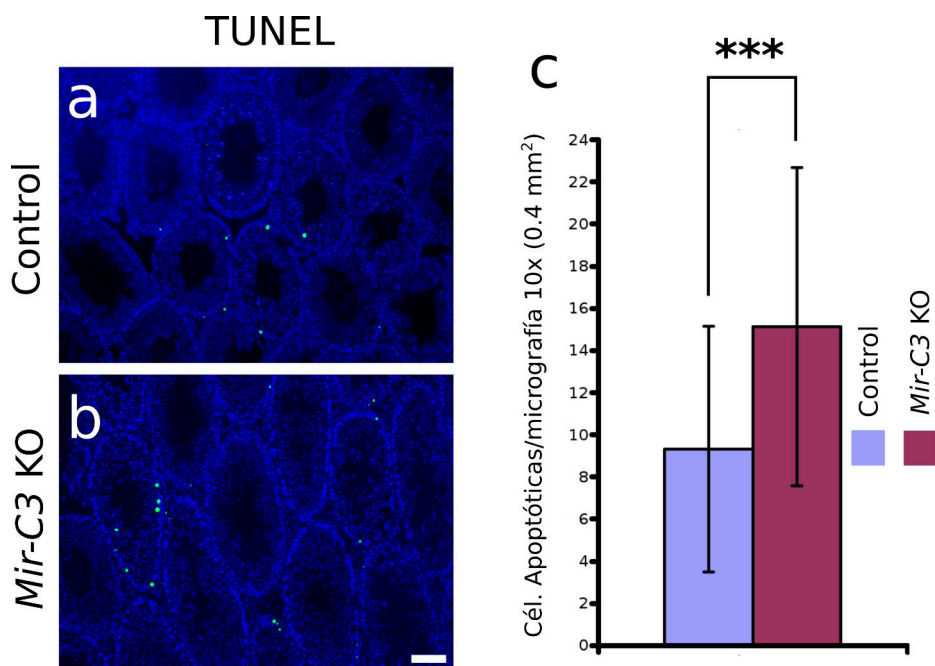


Figura 4.33: Apoptosis en los testículos *Mir-C3* KO: Ensayo de TUNEL en un corte histológico de testículos control (a) y *miR-106b-25*^{-/-} (*Mir-C3* KO) (b). Comparación del número de células apoptóticas en testículos controles y mutantes (*Mir-C3* KO) (c) La barra de escala en b representa 100 μ m para a y b.

ninguna diferencia significativa entre ambas condiciones (n= 5; control: 2.42 ± 1.20 ng/ml; mutante: 2.35 ± 0.9 ng/ml; *t*-student de dos colas, $p = 0.93$; Figura 4.35 A). Consistente con estos resultados, el peso de la vesícula seminal, que depende de la concentración de testosterona circulante, fue similar entre mutantes y controles (n= 6; control: 286.8 ± 35.4 g; mutante: 254.3 ± 17.6 g; *t*-student de dos colas, $p = 0.08$; Figura 4.35 B). Estos resultados indican que el fenotipo de los testículos carentes de *miR-106b-25* probablemente se deba a anomalías en procesos que normalmente ocurren durante la espermatogénesis cuyo origen no es la disminución en los niveles de testosterona.

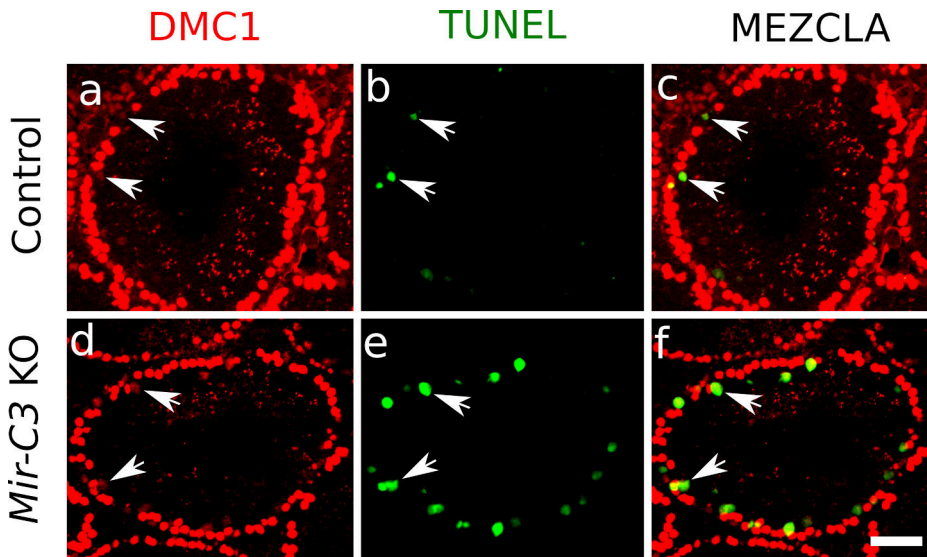


Figura 4.34: Inmunofluorescencia DMC1/TUNEL: Doble inmunofluorescencia para DMC1 (a, d) y para TUNEL (b, e) en ratones controles (a-c) y mutantes para *miR-106b-25* (*Mir-C3* KO) (d-f). Nótese que en los ratones mutantes la mayoría de células que están muriendo (positivas para TUNEL, verdes) también son positivas para DMC1 (rojas). La barra de escala en f representa 50 μm para todas las micrografías.

4. RESULTADOS

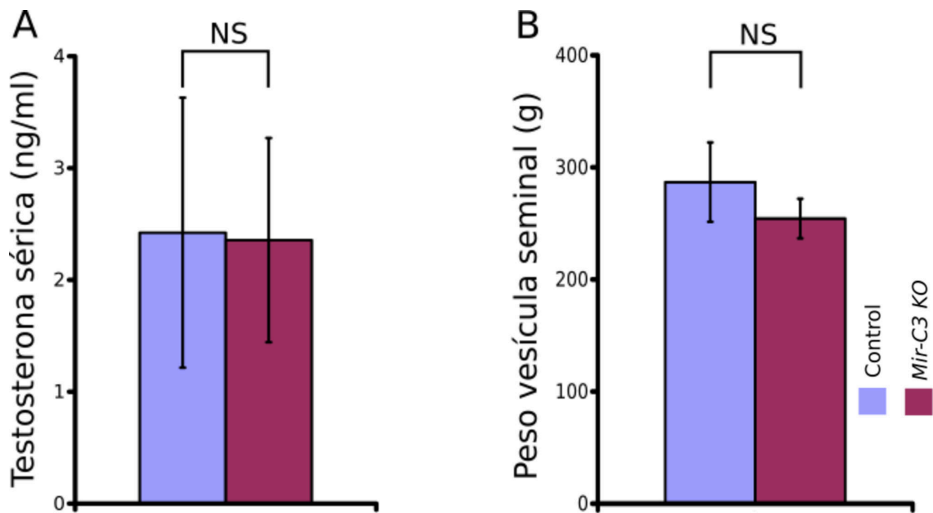


Figura 4.35: Testosterona vs. peso SV: Comparación de los niveles de testosterona sérica (A) y del peso de las vesículas seminales (B) entre ratones controles y *miR-106b-25^{-/-}* (*Mir-C3* KO).

El análisis del transcriptoma revela alteración en las rutas moleculares implicadas en la espermatogénesis de los ratones mutantes para el clúster *miR-106b-25*.

Para encontrar un mecanismo molecular que pudiese explicar el fenotipo presentado por los ratones *miR-106b-25*^{-/-}, hicimos un análisis transcriptómico mediante RNA-seq de tres testículos controles y tres testículos mutantes de ratones con dos meses de edad. Las diferencias entre los perfiles de expresión de estas muestras fueron analizadas mediante un análisis de clustering jerárquico. Observamos que las muestras correspondientes a la misma condición se agrupaban juntas, indicando que el transcriptoma del testículo está significativa y consistentemente alterado cuando el clúster *miR-106b-25* está deletado en los testículos (Figura 4.36).

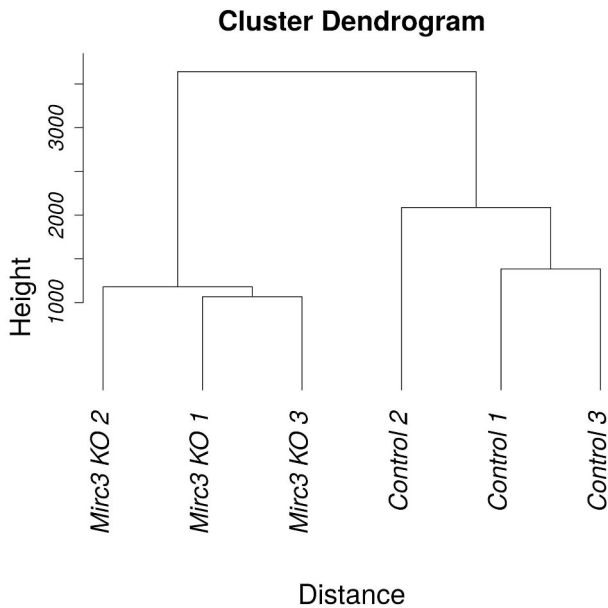


Figura 4.36: Clusterización jerárquica: Análisis de clustering jerárquico de los transcriptomas procedentes de testículos de ratones controles y *miR-106b-25*^{-/-} (*Mir-C3* KO).

A continuación, usando el programa bioinformático EdgeR hicimos un

4. RESULTADOS

análisis de expresión diferencial entre ambas condiciones. Encontramos 2 255 genes desregulados con una p ajustada (FDR) $<10\%$. De ellos, 1 068 estaban sobre-expresados y 1 187 reprimidos ((ver tabla en apéndice DE_genes.txt).

El “smear plot” del test de expresión diferencial mostró que la gran mayoría de genes diferencialmente expresados estaban desregulados menos de dos veces, indicado que, aunque existe una desregulación reproducible de muchos genes, la magnitud de este cambio es generalmente muy moderada (Figura 4.37).

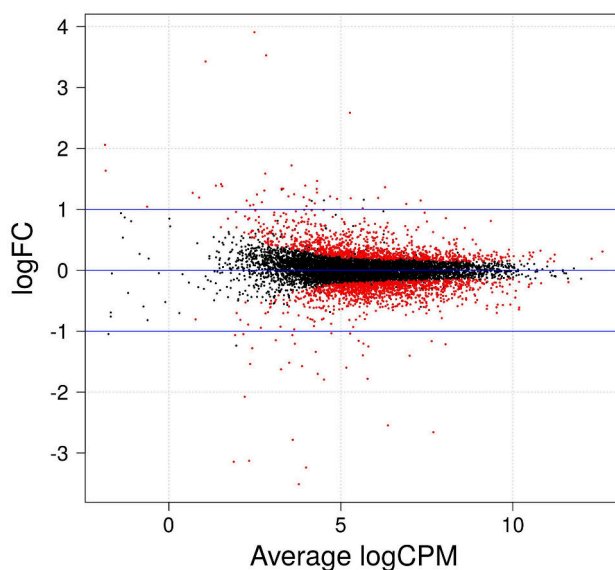


Figura 4.37: Plot de dispersión: Test de expresión diferencial de los transcriptomas procedentes de testículos de ratones controles y *miR-106b-25^{-/-}* (*Mir-C3* KO).

El análisis de ontología génica (GO) de los genes expresados diferencialmente dio como resultado una serie de categorías que podían ser agrupadas en 3 categorías generales: ciclo celular y reproducción (amarillo), procesos de microtúbulos (púrpura) y ubiquitinación y catabolismo (verde) (Figura 4.38; (ver tabla en apéndice GO_.txt).

Un resultado similar se obtuvo cuando hicimos el análisis de interacción

4.3. *MIR-106B-25* EN LA FUNCIÓN TESTICULAR

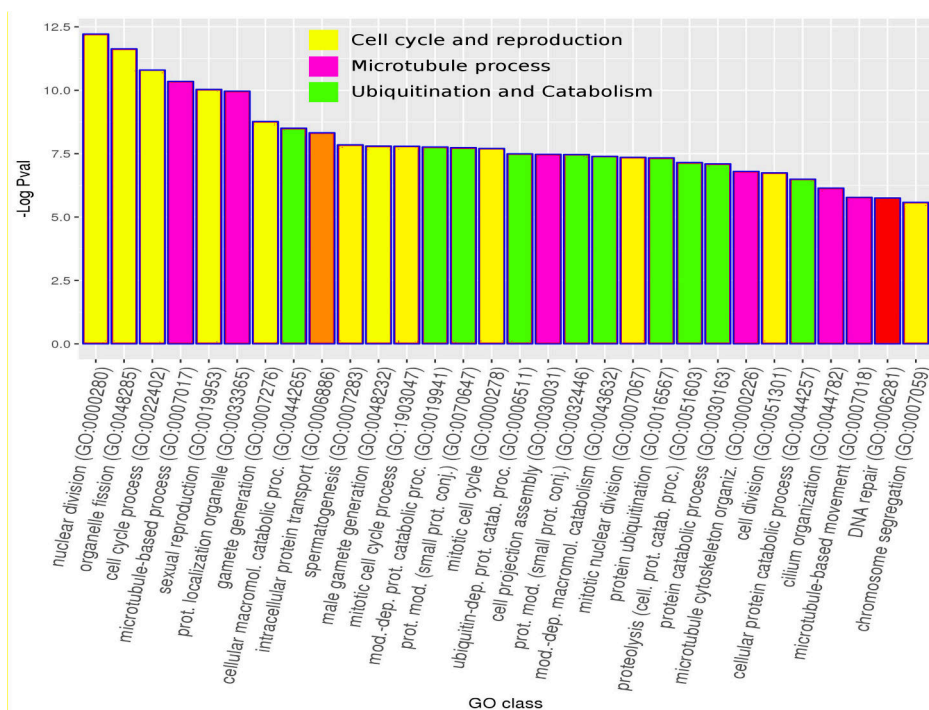


Figura 4.38: Análisis de términos GO: Análisis de ontología génica (GO) de los genes expresados diferencialmente entre los testículos controles y *miR-106b-25*^{-/-}.

proteína-proteína de los genes expresados diferencialmente. Encontramos una red extensa y muy interconectada en la que pudimos diferenciar claramente algunas sub-redes. El análisis GO de las sub-redes reveló la existencia de una sub-red central enriquecida en genes relacionados con la ubiquitinación (Figura 4.39 C). Interconectada con esta red encontramos 4 redes: dos enriquecidas en genes relacionados con procesos que tienen lugar durante la espermatogénesis como son “ciclo celular” (Figura 4.39 A) y “formación de microtúbulos” (Figura 4.39 B), y otras dos en procesos relacionados con la función de los miRNAs, como son “procesamiento de RNA” (Figura 4.39 E) y “traducción” (Figura 4.39 F).

Los miRNAs individuales de los 3 parálogos *miR-17-92* pueden ser agrupados en 4 familias atendiendo a la secuencia de sus semillas, que es

4. RESULTADOS

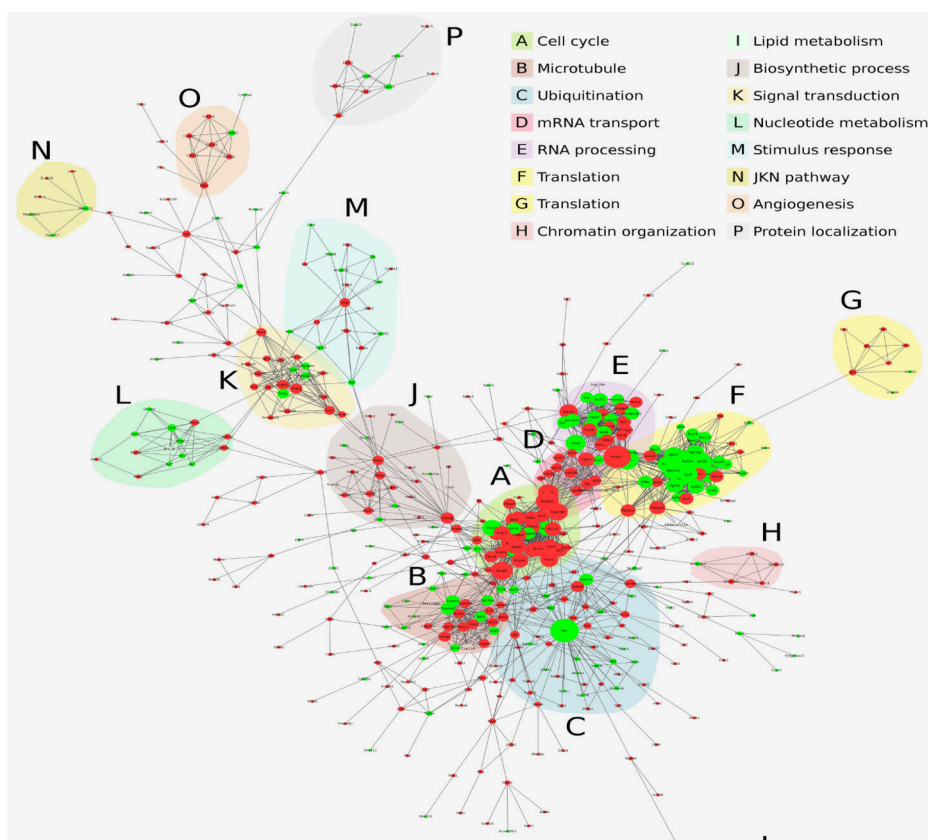


Figura 4.39: Interacciones proteína-proteína: Análisis de interacción proteína-proteína de los genes expresados diferencialmente entre los testículos controles y *miR-106b-25*^{-/-}. En rojo están representado los genes reprimidos y en verde los sobre-expresados. El tamaño de los círculos es proporcional al número de conexiones de los genes

la parte más importante para la selección de dianas. El grupo *miR-106b-25* posee tres miRNAs, *miR-93* y *miR-106b* que pertenecen a la familia *miR-17*, y otro miembro, *miR-25*, que pertenece a la familia *miR-92*. Teniendo en cuenta esto, nosotros buscamos genes dianas de las dos familias que estuviesen sobre-expresados en los testículos mutantes. Para la familia *miR-17* encontramos 30 genes [ver tabla Semilla_mir25](#) y para la familia *miR-92* localizamos 16 genes ([ver tablas Semilla_mir106_93](#)).

4.3. *MIR-106B-25* EN LA FUNCIÓN TESTICULAR

A continuación buscamos las posiciones de estos genes en la red. Para los genes diana de la familia *miR-92* no encontramos nada significativo. Por el contrario, para los genes diana de la familia *miR-17* encontramos un gen con muchas conexiones localizado en la subred de ubiquitinación (Figura 4.40). Este círculo se corresponde con el gen Ubiquitina C (*Ubc*), que codifica para un precursor de poliubiquitinas (Figura 4.41). Las ubiquitinas son pequeñas proteínas implicadas en multitud de procesos biológicos tales como degradación de proteínas, reparación del DNA, regulación del ciclo celular, modificación por quinasas, endocitosis y regulación de otras rutas de señalización molecular.

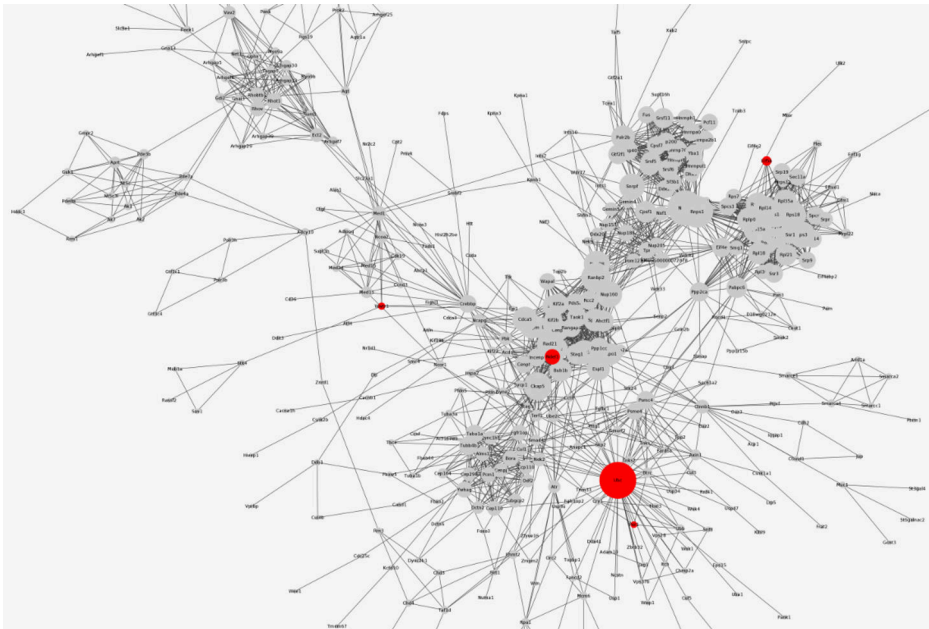


Figura 4.40: Genes diana: Posición de los genes diana para la familia *miR-17* sobre-expresados en la red de proteína-proteína formada por los genes desregulados en testículo de ratones mutantes para el grupo *miR-106b-25*. Los genes se indican en color rojo.

5. Discusión

5.1 Papel de *Sox9/8* en el testículo adulto

5.1.1 La batalla de los sexos persiste después de la etapa de determinación sexual

Estudios recientes han proporcionado evidencias de que la naturaleza bipotencial de la gónada embrionaria indiferenciada no se pierde por completo una vez que los testículos y los ovarios adquieren su morfología y funcionalidad en el adulto. Durante el desarrollo embrionario las células de Sertoli recién diferenciadas se pueden transdiferenciar en sus homólogas ováricas cuando pierden algunos factores pro-testiculares, entre los que se incluyen *Sox9* o *Dmrt1* (Barrionuevo *et al.*, 2009; Georg *et al.*, 2012; Matson *et al.*, 2011a). No obstante, el descubrimiento de que *Foxl2* en el ovario adulto previene la transdiferenciación de células de la granulosa a células de Sertoli reveló que este antagonismo también opera en la gónada adulta. En los testículos adultos parece ocurrir algo similar, ya que tras la ablación de *Dmrt1*, se detectan células positivas para FOXL2 (Matson *et al.*, 2011a). En este trabajo, nosotros hemos demostrado que la transdiferenciación de células de Sertoli a células de la granulosa también se induce en los testículos de ratones adultos simplemente eliminando dos genes *SoxE*, *Sox9* y *Sox8*. Estos resultados evidencian que *Sox9* tiene un papel crucial, no sólo durante la determinación del sexo y la diferenciación de los testículos, sino también en el mantenimiento de los testículos adultos, donde, junto con *Sox8* y coordinadamente con *Dmrt1*, previenen la reprogramación genética de macho a hembra.

La interacción entre *Dmrt1* y *Sox9* durante la formación y desarrollo del testículo parece variar en las diferentes etapas. Así, durante la

5. DISCUSIÓN

determinación del sexo en ratón, tanto *Sox9* como *Dmrt1* se expresan en los testículos embrionarios (Raymond *et al.*, 1999; Kent *et al.*, 1996), pero, mientras que los ratones mutantes para *Sox9* muestran reversión sexual XY (Barrionuevo *et al.*, 2006; Chaboissier *et al.*, 2004), los ratones mutantes para *Dmrt1* desarrollan testículos que expresan *Sox9* y parecen histológicamente normales hasta el estadio postnatal P7 (Raymond *et al.*, 2000). Por lo tanto, la expresión de *Sox9* es independiente de DMRT1 durante la determinación del sexo y algún tiempo después. De manera similar, la inactivación de *Sox9/8* específicamente en células de Sertoli comenzando en el estadio embrionario E13.5, poco después del momento de determinación del sexo, conduce a una rápida disminución de *Dmrt1* que se hace visible cuatro días después, en el estadio E17.5 (Georg *et al.*, 2012). Por el contrario, la ablación de *Dmrt1* en células de Sertoli a partir del estadio E13.5 no tiene efectos fenotípicos evidentes durante el desarrollo testicular embrionario. En estos testículos la expresión de *Sox9* se pierde alrededor del estadio P14 (un mes más tarde de lo que ocurre con *Dmrt1* en los testículos *Sox9*^{-/-}), coincidiendo con un aumento en la expresión de *Foxl2* (Matson *et al.*, 2011a). Esto sugiere, de nuevo, que la expresión de *Sox9* es independiente de *Dmrt1* en las células de Sertoli recién diferenciadas y que, tras la ablación de *Dmrt1*, la pérdida de SOX9 es una consecuencia secundaria de la acción de los genes ováricos que comienzan a sobre-expresarse, como *Foxl2*. A pesar de esto, otras observaciones sugieren la transactivación de SOX9 por DMRT1:

- a) DMRT1 se une cerca del locus de *Sox9* en testículos de ratón en el estadio P28 (Matson *et al.*, 2011a),
- b) la expresión ectópica de *Dmrt1* en las gónadas embrionarias XX causa reversión sexual XX y un aumento de la expresión de *Sox9* (Zhao *et al.*, 2015), y
- c) las cabras “polled”, que poseen una mutación en *FOXL2* y presentan reversión sexual XX, experimentan un proceso de transdiferenciación en el cual la expresión de *DMRT1* precede a la expresión de *SOX9* (Elzaiat *et al.*, 2014).

En los dos últimos casos, sin embargo, los genes promotores del desarrollo femenino, incluyendo a *FOXL2*, están, o bien sub-expresados,

5.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO

o bien no se expresan, y, por lo tanto, el aumento observado en la expresión de *SOX9* podría ser, de nuevo, una consecuencia indirecta del silenciamiento de genes pro-ováricos. Nosotros hemos demostrado que, en la gónada adulta, las células de Sertoli mutantes para *Sox9/8* pierden DMRT1, y que simultáneamente aparece la proteína FOXL2. Esta observación es consistente con la noción de que la expresión de *Dmrt1* es dependiente de *SOX9/8* y que DMRT1 reprime a *Foxl2*. Otras observaciones que apoyan esta hipótesis son:

- a) Casi todos los genes cuya expresión se ve fuertemente afectada por la pérdida de DMRT1 también sufren una alteración similar en su expresión tras la eliminación de *SOX9/8*.
- b) La transdiferenciación de células de Sertoli en células de la granulosa, apreciada en los testículos mutantes para *Sox9/8*, se reduce al disminuir los niveles de ácido retinoico, una molécula clave en una ruta de señalización molecular implicada en la sobre-expresión de *Foxl2* y la posterior transdiferenciación Sertoli-granulosa. Tal y como ocurre con *SOX9/8*, esta ruta también está bloqueada por DMRT1 (Minkina *et al.*, 2014).
- c) DMRT1 puede silenciar a *Foxl2* en ausencia de *SOX9* y *SOX8* (Lindeman *et al.*, 2015)
- d) En ovarios adultos con expresión ectópica de *Dmrt1*, la expresión de *Sox9* aumenta coincidiendo con la disminución de *Foxl2* (Lindeman *et al.*, 2015).

En resumen, los datos disponibles sugieren que, al igual que en los estadios previos, *SOX9/8* poseen un papel esencial en el mantenimiento del sexo masculino en adultos, y se encargan de regular positivamente a *Dmrt1*. A su vez, este último gen tiene un papel fundamental en la represión de los genes específicos del desarrollo femenino. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que DMRT1 también sea necesario para el mantenimiento de la expresión de *Sox9* en los testículos adultos y que exista un bucle de retroalimentación entre *Sox9/8* y *Dmrt1* que asegure el mantenimiento de la función testicular y se oponga a la acción

5. DISCUSIÓN

feminizadora de *Foxl2*. Experimentos adicionales, como, por ejemplo, el análisis temporal de la expresión de *Sox9* en ratones adultos con una mutación para *Dmrt1* en células de Sertoli, ayudarían a aclarar este interrogante.

Varios trabajos han sugerido que *Wt1* actúa aguas arriba de *Sox9* y *Sox8* durante el desarrollo embrionario de los testículos (Barrionuevo *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2006). En los testículos adultos mutantes para *Sox9/8* hemos visto que la expresión de *Wt1* se mantiene inicialmente, pero posteriormente va disminuyendo a medida que la expresión de *Foxl2* va aumentando. Esto sugiere que *Wt1* mantiene su posición jerárquica en los testículos adultos, y que, factores feminizadores, como *Foxl2*, pueden estar involucrados en su silenciamiento. De acuerdo con estudios previos (Schmidt *et al.*, 2004; Chun *et al.*, 1999), hemos observado que existen dos tipos de células de la granulosa en el ovario adulto normal: 1) aquéllas localizadas en los folículos antrales (maduros), que expresan *FOXL2* pero no *WT1*, y 2) aquéllas localizadas en los folículos pre-antrales, que expresan ambas proteínas. Si tenemos en cuenta estas observaciones, la transdiferenciación de las células de Sertoli que ocurre en los testículos mutantes para *Sox9/8* parece dar lugar a células de la granulosa similares a las existentes en los folículos antrales. Este patrón de expresión también sugiere que *WT1* puede jugar un papel antifeminizador en las células adultas de Sertoli.

5.1.2 SOX9 y SOX8 son necesarios para mantener la arquitectura tubular y la función de los testículos adultos

Como hemos demostrado en este trabajo, la redundancia funcional de los alelos *Sox9* y *Sox8* observada durante el desarrollo de las células embrionarias de Sertoli (Barrionuevo *et al.*, 2009) y el desarrollo de otros tipos celulares (Reginensi *et al.*, 2011; Chaboissier *et al.*, 2004; Stolt *et al.*, 2004), también ocurre en las células de Sertoli adultas. El fenotipo de los testículos mutantes se hace cada vez más severo a medida que aumenta el número de alelos *SoxE* mutados, resultando en un fenotipo testicular extremo en los ratones homocigóticos dobles mutantes para *Sox9/8*. En

5.1. PAPEL DE *SOX9/8* EN EL TESTÍCULO ADULTO

estos últimos ratones, los túbulos seminíferos desaparecen completamente a los 4 meses después del inicio del tratamiento con tamoxifeno.

La proliferación de las células de Sertoli va disminuyendo progresivamente en los estadios postnatales, y se detiene completamente una vez que el testículo adquiere su apariencia adulta (Kluin *et al.*, 1984). Por lo tanto, una disminución en la proliferación celular difícilmente podría explicar la reducción en el número de células de Sertoli que se observa en los testículos mutantes para *Sox9/8*. Una posible explicación para este fenómeno puede ser que, tras la pérdida de ambos factores SOXE, las células de Sertoli se vuelven apoptóticas, una situación que ya ha sido descrita en otros órganos en desarrollo en los que se ha eliminado *Sox9* (Barrionuevo *et al.*, 2008; Akiyama *et al.*, 2002; Cheung *et al.*, 2005; Seymour *et al.*, 2007). Nosotros hemos demostrado que, a los 30 datx ya existen algunas células apoptóticas. Sin embargo, estas células son negativas para SOX9 y FOXL2, indicando que tanto la células que no han sufrido una delección de *Sox9*, como las células recién transdiferenciadas (FOXL2⁺), están protegidas de la apoptosis. Por el contrario, a los 90 datx la apoptosis en los cordones testiculares era generalizada. En estas etapas tardías de la regresión testicular, la estructura del cordón estaba tan dramáticamente comprometida que incluso las células de Sertoli positivas para SOX9 mostraban apoptosis. Es bien sabido que el número de células de Sertoli debe alcanzar un umbral crítico para organizar los cordones testiculares embrionarios (Palmer & Burgoyne, 1991; Schmahl & Capel, 2003). Por consiguiente, nuestros resultados sugieren que los túbulos seminíferos de los testículos adultos también requieren la presencia de un número mínimo de células de Sertoli para ser mantenidos. La pérdida progresiva de células de Sertoli después de la ablación de *Sox9/8*, ya sea por apoptosis, o por transdiferenciación en células de la granulosa, parece alcanzar un punto de no retorno en el que las células de Sertoli normales que permanecen en los túbulos son incapaces de soportar la estructura tubular y también comienzan a morir. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que los factores SOXE son necesarios para mantener la identidad de las células de Sertoli y la integridad de los túbulos seminíferos.

El fenotipo observado en los cordones testiculares de los ratones mutantes para *Sox9/8* puede ser explicado, al menos parcialmente, si consideramos que estos genes están implicados en la regulación de la

5. DISCUSIÓN

expresión de proteínas estructurales. Así, si tenemos en cuenta que:

- a) SOX9 controla, tanto directa (Bell *et al.*, 1997) como indirectamente (Georg *et al.*, 2012; Barrionuevo *et al.*, 2008) la expresión de proteínas de la matriz extracelular, estructura que contribuye de manera importante a la integridad tubular,
- b) los ratones Sox8^{-/-} muestran un aumento en la permeabilidad de la barrera hematotesticular (BTB) y una reducción de los niveles de acetilación de la tubulina α , lo que sugiere que el deterioro del citoesqueleto celular de las células de Sertoli puede haber modificado la homeostasis del epitelio seminífero (Singh *et al.*, 2013),
- c) los ratones dobles mutantes para *Sox9/8* específicamente en células de Sertoli embrionarias (Georg *et al.*, 2012; Barrionuevo *et al.*, 2009) o adultas (presente trabajo) experimentan una alteración en la expresión de varias proteínas importantes para la formación de los complejos de adhesión que existen entre las células germinales y las células de Sertoli y entre las células de Sertoli entre sí,
- d) la espermatogénesis se detiene cuando la funcionalidad de la BTB se ve afectada (Dadhich *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2005), y
- e) que en los ratones adultos dobles mutantes *Sox8/9* (presente trabajo) se produce un aumento de la permeabilidad de la BTB y un deterioro del citoesqueleto, que puede dar lugar a un microambiente intratubular inestable en el que ya no se mantiene la espermatogénesis y las células germinales sufren apoptosis y descamación,

podemos concluir que, el fracaso de las células de Sertoli dobles mutantes *Sox9/8* para sostener la arquitectura tubular de los testículos es una consecuencia directa de la expresión alterada de las moléculas de adhesión celular y probablemente de otros elementos estructurales como los componentes del citoesqueleto o la matriz extracelular.

En cuanto a las células somáticas de los testículos, las células mioides peritubulares (PM) desaparecen en los testículos mutantes, mientras que las células de Leydig parecen no estar afectadas, ya que mantienen la

expresión de los marcadores celulares de Leydig, como *HSD17b3* e *Insl3*. Aunque durante el desarrollo temprano de los testículos, las células de Sertoli inducen la diferenciación de las células PM y Leydig (para una revisión ver Svingen & Koopman (2013)), en etapas posteriores del desarrollo (estadio E14.5 y posteriores), las células de Leydig no requieren a las células de Sertoli para su proliferación y síntesis de testosterona (Gao *et al.*, 2006). Nuestros resultados en el testículo adulto, muestran que las células PM conservan su dependencia original de las células de Sertoli, mientras que el mantenimiento de las células de Leydig es independiente de las células de Sertoli. Experimentos adicionales nos permitirán descifrar cuál es el estado funcional real de las células de Leydig en los testículos mutantes *Sox9/8*.

5.1.3 Un modelo regulador para el mantenimiento del testículo adulto en ratones

De acuerdo con las consideraciones anteriores, hemos propuesto un modelo para el mantenimiento de las células de Sertoli en los testículos adultos. En este modelo (Figura 5.1):

- *Sox9/8* juegan un papel central, manteniendo activo a *Dmrt1*, que previene la expresión de genes pro-ovaricos, incluyendo a *Foxl2*,
- *Foxl2*, a su vez, regula negativamente a *Sox9/8* y/o *Dmrt1*,
- *Dmrt1* inhibe la ruta de señalización del ácido retinoico (RA), que promueve la expresión de *Foxl2*, aunque no se puede descartar una interferencia de *Sox9* en esta vía de señalización a través de un mecanismo independiente de *Dmrt1*,
- *Wt1* regula positivamente a *Sox9/8* y es regulado negativamente por *Foxl2* y/u otros genes específicos del ovario,
- *Sox9/8* también son necesarios para mantener la expresión de los genes estructurales importantes del testículo y para proteger a las células de Sertoli de la apoptosis.
- Todo lo anterior esta reflejado en la Figura 5.1 con líneas sólidas.

5. DISCUSIÓN

- También es posible que *Dmrt1* pueda establecer un bucle de retroalimentación con *Sox9/8* y que *Sox9/8* repriman la expresión de mRNAs específicos del ovario a través de mecanismos independientes de *Dmrt1*, aunque estas interacciones están menos apoyadas por los datos disponibles (Figura 5.1, líneas discontinuas).

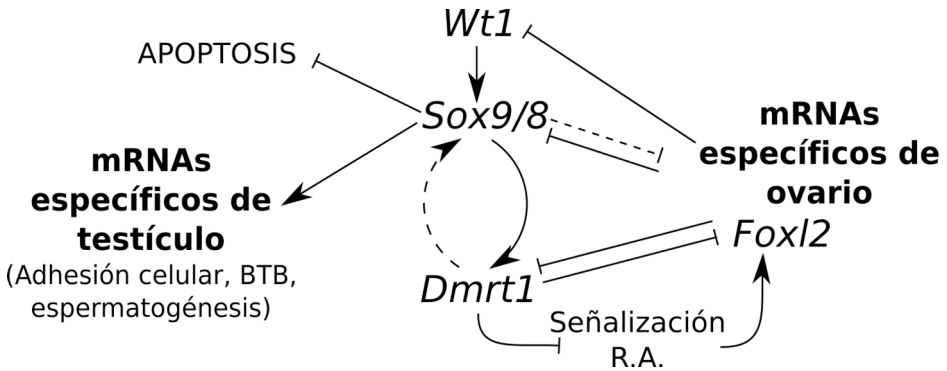


Figura 5.1: Modelo: El esquema representa nuestro modelo para la regulación del mantenimiento del sexo en mamíferos. La regulación positiva se indica mediante flechas. La regulación negativa se indica mediante líneas perpendiculares. Ver el texto para una explicación más detallada.

En conclusión, hemos demostrado que los genes *Sox9/8* tienen importantes funciones, dependientes e independientes de DMRT1, en el mantenimiento de los testículos adultos. En su ausencia, los testículos, que inicialmente son fenotípicamente normales, son reprogramados genéticamente y se produce la transdiferenciación de células de Sertoli a células de la granulosa. Sin embargo, esta situación es meramente transitoria, ya que las células de Sertoli adultas mutantes para *Sox9/8* sufren un proceso degenerativo e irreversible.

5.2 Función de *miR-17-92* en el testículo

5.2.1 La ablación de *miR-17-92* en las células de Sertoli altera significativamente el transcriptoma testicular

La delección específica de *Dicer* en las células de Sertoli embrionarias resulta en un desarrollo anormal de los testículos y en anomalías durante la espermatogénesis, lo que evidencia la importancia de los miRNAs en la diferenciación y función de este tipo celular (Kim *et al.*, 2010; Papaioannou *et al.*, 2009). Varios autores han descrito la expresión específica de un gran número de miRNAs en las células de Sertoli (Ortogero *et al.*, 2013; Papaioannou *et al.*, 2009), pero poco se sabe sobre el papel de estos reguladores de la traducción en ellas. Motivados por varios estudios que muestran la expresión de los miembros del clúster *mir-17-92* en las células de Sertoli (Ortogero *et al.*, 2013; Tong *et al.*, 2012; Panneerdoss *et al.*, 2012; Papaioannou *et al.*, 2009), y conociendo sus papeles relevantes en otros órganos y en diferentes enfermedades (ver la sección de Introducción), decidimos inducir la ablación condicional de este clúster en las células de Sertoli embrionarias poco después del momento de determinación sexual (ratones *Amh-Cre;Mir-17-92^{f/f}*, ver sección Resultados). Aunque los testículos SC-*miR-17-92* KO adultos mostraron un desarrollo y función aparentemente normal, los análisis del RNA-seq evidenciaron una desregulación consistente de numerosos genes, indicando que la expresión del clúster *miR-17-92* en las células de Sertoli es necesaria para mantener los niveles de expresión de muchos genes testiculares dentro de los valores normales. Si tenemos en cuenta esto, es lógico preguntarnos porqué tal alteración en la homeostasis del transcriptoma no resulta en un fenotipo observable. Para responder a esta cuestión, lo primero que debemos considerar es que, a pesar de que hay un elevado número de genes desregulados en los testículos SC-*miR-17-92* KO, la magnitud de los cambios en sus niveles de expresión es generalmente modesta (menos de dos veces en la mayoría de los casos). Este escenario, con muchos genes desregulados mostrando cambios moderados en sus niveles de expresión, se ha descrito previamente para el clúster *miR-17-92*, y es consistente con la propuesta de que sus miembros actúan como reguladores finos de grandes redes genéticas en lugar de controlar la expresión de genes con un papel esencial en rutas moleculares (Han *et al.*,

5. DISCUSIÓN

2015).

Las consecuencias fenotípicas de las alteraciones del transcriptoma inducidas por la ausencia de *miR-17-92* pueden ser variables y difíciles de predecir. Por ejemplo, a pesar de que el número de genes desregulados en transcriptomas realizados a partir de RNA procedente de la cola de embriones mutantes homocigóticos para la semilla *miR-17* (~ 500) fue menor que el observado a partir de transcriptomas del mismo tejido de embriones mutantes homocigotos para la semilla *miR-19* (~ 700), en los primeros ratones se observaron malformaciones esqueléticas (defectos en la regulación del patrón axial), pero no en los segundos. Por lo tanto, parece que la severidad del fenotipo derivado de la ausencia del clúster *miR-17-92* depende del contexto espacial y temporal. Nuestros resultados indican que la homeostasis testicular debe de estar estrictamente controlada, ya que, incluso cuando cientos de genes están desregulados en todos los tipos de celulares de los testículos mutantes, éstos no muestran ningún fenotipo patológico evidente, conservando la estructura y función normal. Esta ausencia de fenotipo probablemente se debe a que muchos otros factores reguladores contribuyen a mantener la homeostasis testicular, ya que la simple ablación de *miR-17-92* no es suficiente para alterarla significativamente. A pesar de esto, existe la posibilidad de que los testículos mutantes se vuelvan más sensibles a las situaciones estresantes. De acuerdo con esta idea, recientemente se ha demostrado que los ratones mutantes condicionales para *miR-17-92* en hepatocitos eran fértiles y aparentemente sanos, aunque su capacidad de regeneración hepática después de una lesión tisular había resultado significativamente reducida (Zhou *et al.*, 2016). Por lo tanto, aunque no se observa ningún fenotipo testicular obvio, la alteración que detectamos en el transcriptoma de nuestros mutantes *miR-17-92* podría causar un estado funcional subóptimo del testículo en situaciones de estrés.

En cultivos celulares se ha observado que los genes con dianas putativas para un determinado miRNA se desregulan preferentemente poco después de la transfección con el miRNA (Lim *et al.*, 2005). De acuerdo con esto, el análisis del transcriptoma de las colas de embriones mutantes homocigotos para *miR-17-92* en el estadio E9.5 (antes de la aparición de cualquier anomalía en el desarrollo), mostró que los genes que tenían diana para los miembros individuales de este clúster de miRNAs en su

5.2. FUNCIÓN DE *MIR-17-92* EN EL TESTÍCULO

región 3' UTR, aparecían principalmente sobre-regulados (Han *et al.*, 2015). Estas observaciones difieren con nuestros resultados, ya que no encontramos un aumento preferencial de los genes con diana para el clúster *miR-17-92* en los transcriptomas de los testículos mutantes. En nuestros ratones mutantes, el clúster *miR-17-92* se deletionó condicionalmente en las células de Sertoli en E14, pero los transcriptomas se analizaron nueve semanas después, en P60. Por lo tanto, estos transcriptomas no reflejan los efectos primarios derivados de la delección de este clúster, sino probablemente otros efectos inducidos con posterioridad por una reacción en cadena de genes desregulados a lo largo del tiempo. El hecho de que no observáramos un fenotipo severo o incluso moderado en los testículos mutantes, hizo difícil seleccionar un punto de tiempo más conveniente para analizar el transcriptoma. Otra limitación de nuestro estudio es que sólo pudimos analizar el transcriptoma del testículo completo, donde los espermatozoides y especialmente las espermátidas contribuyen de forma muy significativa al número total de células y al volumen del testículo (Soumillon *et al.*, 2013). Por lo tanto, la búsqueda de dianas de miRNAs utilizando nuestros datos de transcriptoma es probablemente inútil o incluso engañosa.

Los análisis de términos de ontología génica (GO) de genes desregulados en los testículos *SC-miR-17-92* KO mostraron un enriquecimiento significativo en procesos biológicos asociados con algunas funciones específicas de la células germinales, por ejemplo, espermatogénesis, meiosis y desarrollo de espermátidas. Como esta alteración puede no ser una consecuencia directa de la desregulación de los genes diana para *miR17-92* y de sus redes de genes asociados en las células de Sertoli, buscamos genes desregulados específicamente en las células de Sertoli mutantes para *miR-17-92*. El análisis GO reveló que este conjunto de genes específico de las SC estaba enriquecido en términos asociados con la adhesión celular, la unión a la actina y el citoesqueleto. Esto es consistente con el hecho de que las células germinales migran progresivamente a través del epitelio seminífero durante la espermatogénesis hasta llegar al lumen tubular. A lo largo de esta migración, las células germinales permanecen unidas a las SC a través de moléculas de adhesión celular, que evitan el desprendimiento prematuro de las células germinales inmaduras del epitelio seminífero, un fenómeno que puede conducir a la infertilidad (Kopera

5. DISCUSIÓN

et al., 2010; Dadhich *et al.*, 2013). Además, las estructuras especializadas de adhesión celular establecidas entre células de Sertoli adyacentes forman la barrera hematotesticular (BTB), que aísla a las células germinales post-meióticas de la circulación sistémica (Cheng & Mruk, 2002). Por otro lado, las células de Sertoli tienen un citoesqueleto complejo, bien organizado y funcionalmente activo que requiere abundantes proteínas filamentosas y microtúbulos para mantener su integridad estructural y sostener a las células germinales vecinas (Vogl *et al.*, 2008). Algunas de estas moléculas están desreguladas en los testículos mutantes. Entre ellas encontramos a *Cldn11*, que codifica para CLAUDINA 11, un componente principal de las uniones estrechas que forman la BTB. La mutación de este gen origina fallos en la espermatogénesis y causa esterilidad masculina (Gow *et al.*, 1999). Otros genes afectados en los testículos SC-*miR-17-92* KO fueron *Itgb1*, que codifica para la β -integrina, un receptor de adhesión celular esencial necesario para alojar las células madre espermatogoniales en su nicho (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008), *Tjp1* (o *ZO-1*) que codifica para la proteína de unión estrecha 1, y *Jup* que codifica para la placoglobina. Las dos últimas son proteínas de adhesión esenciales en las uniones entre células de Sertoli y entre células de Sertoli y células germinales (Cheng & Mruk, 2002). Con todas estas evidencias, es plausible pensar que la ablación específica del clúster *miR-17-92* en células de Sertoli provoca la desregulación de moléculas de adhesión celular presentes en los contactos celulares mediante los que se establece el “cross-talk” entre células de Sertoli y células germinales, resultando así en una alteración de sus transcriptomas.

En el genoma de ratón, existen dos parálogos del clúster *miR-17-92*, *miR-106b-25* y *miR-106a-363*. Durante el desarrollo embrionario se ha demostrado que existe redundancia funcional entre los dos primeros clústers (Han *et al.*, 2015). Consistente con esto, la expresión de estos dos clústers se ha encontrado en la mayoría de los tejidos analizados. Por el contrario, para el clúster *miR-106a-363* no se ha detectado expresión en la mayoría de los tejidos analizados hasta la fecha, incluidos los testículos adultos (Ventura *et al.*, 2008). Se sabe que los miembros individuales del clúster *miR-106b-25* se expresan en células de Sertoli (Ortogero *et al.*, 2013), por lo que podrían compensar la ausencia del clúster *MirC1* en nuestros ratones mutantes. Para comprobar esta posibilidad, es necesario

analizar el fenotipo testicular de los dobles mutantes *miR-17-92;miR-106b-25*, un trabajo que está actualmente en curso en nuestro laboratorio.

En resumen, hemos generado mutantes condicionales en los que se indujo la ablación de *miR-17-92* específicamente en SC durante el desarrollo embrionario testicular. A pesar de que no hemos observado ninguna alteración fenotípica en los testículos adultos mutantes, el análisis de RNA-seq reveló una alteración consistente y reproducible de su transcriptoma, con cientos de genes moderadamente desregulados. Esto indica que la homeostasis del testículo está estrechamente controlada en mamíferos y que, en las células de Sertoli, los miembros del clúster *miR-17-92* contribuyen a mantener el transcriptoma del testículo dentro de los valores normales, aunque no son esenciales para garantizar el desarrollo y la función normal del testículo.

5.3 *miR-106b-25* en la función testicular

5.3.1 La delección del clúster *miR-106b-25* en los ratones causa alteraciones en la espermatogénesis y oligozoospermia

Varios estudios han mostrado que los clúster *miR-17-92* y *miR-106b-25* se expresan en los diferentes tipos celulares del testículo (Tong *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2013). Además, la delección de *MirC1*, bien en el testículo adulto (Xie *et al.*, 2016), o bien condicionalmente en células germinales (Tong *et al.*, 2012), causa defectos en la espermatogénesis. Por el contrario, en los ratones *miR-106b-25^{-/-}* no se ha descrito ningún fenotipo en el testículo. Sin embargo, estudios *in vitro* sugieren que estos dos clústers de miRNAs pueden tener un papel redundante en la función testicular, ya que tanto la represión de *miR-17-92* como de *miR-106b-25* por el ácido retinoico potencia la expresión de algunos de sus genes diana, entre los que se encuentran *Bim*, *Kit*, *Socs3* y *Stat3*. Además, la ausencia de *miR-17-92* en las células germinales incrementa notablemente la expresión de *miR-106b-25* (Tong *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta todo lo anterior, pensamos que el hecho de que no se haya descrito ningún fenotipo testicular en los ratones *miR-106b-25^{-/-}* probablemente se debe

5. DISCUSIÓN

a que estos ratones son fértiles (Ventura *et al.*, 2008). Por ello, hemos realizado de un estudio detallado del desarrollo y función del testículo. Inicialmente, hemos observado que la masa testicular de estos ratones está reducida, y además presentan oligozoospermia. El análisis del índice de Johnsen en los testículos *Mir-C3* KO ha mostrado que los ratones mutantes poseen abundantes cordones testiculares normales, pero también muchos otros que parecen estar afectados y unos pocos con claros signos de degeneración. Esta alteración de la espermatogénesis está acompañada de una ralentización de la meiosis y de un aumento de la apoptosis a nivel de espermatoцитos. Varios estudios evidencian que el clúster *MirC3* juega un papel importante en la regulación del ciclo celular durante la oncogénesis (Ivanovska *et al.*, 2008; Haldar *et al.*, 2014), y que junto con *MirC1* regulan a varios genes implicados en el control de rutas apoptóticas en diversos procesos biológicos (Liu *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2012). Por lo tanto, es plausible pensar que este clúster de miRNAs pueda tener una función similar en el testículo. Así, los análisis del transcriptoma testicular han revelado que existe un gran número de genes desregulados en los mutantes. Estos genes están enriquecidos en términos GO que se pueden agrupar en tres categorías generales: a) categorías relacionadas con el ciclo celular y la mitosis y meiosis, procesos esenciales durante la espermatogénesis, b) formación de microtúbulos, un proceso esencial para la espermiogénesis y c) ubiquitinación y catabolismo, funciones generales de las células que regulan multitud de procesos biológicos. Para intentar encontrar un mecanismo molecular que explique estas observaciones, y teniendo en cuenta que el efecto más común de los miRNAs es el de inhibir la traducción de mRNAs, nosotros hemos buscado genes que estén sobre-expresados en los testículos mutantes para *miR-106b-25* y que tengan semillas, bien para la familia en la que se encuentra *miR-25* (*miR-17*), o bien para la familia *miR-92*, de la que forman parte *miR-106b* y *miR-93*, los otros dos miembros del clúster. Así, para la familia de *miR-25* destacamos los siguientes genes diana:

- ***Gata2*** (*GATA binding protein 2*): Factor de transcripción que se expresa en diferentes tipos celulares hematopoyéticos incluyendo células madre y precursores de los eritrocitos. Su función es necesaria para la proliferación y supervivencia de células hematopoyéticas tempranas, pero no para la diferenciación posterior de estos tipos

celulares (Lentjes *et al.*, 2016). En el testículo, *Gata2* ha sido propuesto como un gen diana del Receptor de Andr6genos en las c6lulas de Sertoli (Wang *et al.*, 2018).

- ***Sik1*** (*Salt inducible kinase 1*): Este gen se clon6 inicialmente en los adrenes procedentes de ratas con una dieta alta en sal. *Sik1* se expresa en c6lulas adrenocorticales en la fase temprana tras la estimulaci6n con la hormona adrenocorticotr6pica. SIK1 se encuentra principalmente en el n6cleo de c6lulas Y1 en reposo, y parece ser esencial para la inactivaci6n de la prote6na CREB (Kato *et al.*, 2004). Este gen tambi6n parece estar implicado en el control de ciclo celular, ya que la expresi6n ect6pica de un dominio quinasa SNF1LK en c6lulas ov6ricas origina que estas c6lulas no se dividan, aunque llevan a acabo varias rondas de replicaci6n, dando lugar a c6lulas 8N y 16N. Esto indica que *Sik1* puede tener un papel importante en la regulaci6n del punto de control G2/M.
- ***Slc9a1*** (*Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 1*): Este gen codifica para una transportador Na^+/H^+ que pertenece a la familia de transportadores de solutos 9. Se expresa en ri6n, intestino y test6culos, y juega un papel muy importante en la regulaci6n de la homeostasis del pH, en la migraci6n de c6lulas y en el mantenimiento del volumen celular. Tambi6n parece estar implicado en el crecimiento de tumores (Slepkov *et al.*, 2005).
- ***Dusp10*** (*Dual specificity phosphatase 10*): Este gen codifica para una fosfatasa que inactiva a sus dianas mediante la desfosforilaci6n tanto de los residuos fosfoserina/treonina como los de fosfotirosina. Regula negativamente a los miembros de la superfamilia MAP quinasa, que se asocia con la proliferaci6n y diferenciaci6n celular (Jeong *et al.*, 2006).
- ***Ing2*** (*Inhibitor of growth family, member 2*): Este gen pertenece a la familia de inhibidores del crecimiento. Los miembros de esta familia se han asociado con la regulaci6n de la actividad de los complejos de histonas acetil transferasas e histonas desacetilasas, teniendo una funci6n esencial en el control de la reparaci6n del DNA y la apoptosis.

5. DISCUSIÓN

Ing2 está implicado en la activación de p53/TP53 y de las rutas apoptóticas dependientes de p53/TP53 (Nagashima *et al.*, 2001).

- ***Eif5b*** (*Eukaryotic translation initiation factor 5B*): Factor de Iniciación que interacciona con el ribosoma y con otros Factores de Iniciación y con GTP para facilitar que el primer tRNA (metionina) se posicione en el codón de iniciación del mRNA, y que la traducción comience correctamente (Lee *et al.*, 1999).

Por otro lado, entre los genes que están sobre-expresados en los testículos *miR-106b-25^{-/-}* y tienen semilla en la región 3' UTR para la familia de *miR-106b* y *miR-93* (*miR-17*), resaltamos los siguientes:

- ***Stk38*** (*Serine/threonine kinase 38*): *Stk38* codifica para un miembro de la familia de proteínas kinasas de serinas/treoninas AGC, cuya actividad está regulada mediante la autofosforilación y las fosforilación de otras quinasas. *Stk38* interviene en el control del ciclo celular y la apoptosis, además de regular la estabilidad y la actividad transcripcional del oncogene MYC (Enomoto *et al.*, 2008).
- ***Kpna2*** (*Karyopherin (importin) alpha 2*): KPNA2 está involucrada en la translocación de proteínas al núcleo tras interactuar con la señal de localización nuclear (NLS) de algunos factores incluyendo la helicasa de DNA Q1. Una función anómala de este gen se ha asociado a tumores malignos de las células germinales y con tumores del seno endodérmico del ovario (Tseng *et al.*, 2005).
- ***Sik1*** (*Salt inducible kinase 1*): Descrito arriba.
- ***Eif5b*** (*Eukaryotic translation initiation factor 5B*): Descrito arriba.
- ***Slc30a3*** (*Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3*): SLC30A3 es una proteína involucrada en el transporte de glucosa y otros azúcares, sales biliares y ácidos orgánicos. Se expresa en el cerebro, el córtex frontal, huesos y testículos (Palmiter *et al.*, 1996).
- ***Cox20*** (*Cox2 chaperone homolog*): COX20 juega un papel esencial en el ensamblaje de la citocromo C oxidasa, complejo esencial en la

cadena respiratoria. Mutaciones en este gen causan la deficiencia en el complejo mitocondrial IV, caracterizada por ataxia e hipotonía muscular (Szkłarczyk *et al.*, 2012).

- ***Lamtor1*** (*Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator 1*): Factor implicado en la activación de mTORC1, un complejo de señalización que promueve el crecimiento celular en respuesta a factores de crecimiento, niveles de energía y ciertos aminoácidos (Rebsamen *et al.*, 2015).
- ***Abhd5*** (*Abhydrolase domain containing 5*): ABHD5 pertenece a una superfamilia de proteínas que contienen tres dominios con actividad catalítica esterasa, lipasa y tioesterasa. Está implicada en el almacenamiento de triacilglicerol mediante la activación de la fosfolipasa PNPLA2 (Lefèvre *et al.*, 2001).
- ***Atg7*** (*Autophagy related 7*): Este gen codifica una activadora similar a E1 que es esencial para la autofagia celular y para el transporte entre el citoplasma y las vacuolas. ATG7 se ha relacionado con p53 en el control del ciclo celular durante el estrés metabólico prolongado. Este gen se ha asociado a diversas funciones moleculares incluyendo el tráfico a través de la membrana de axones, homeostasis axonal, mitofagia, diferenciación de los adipocitos y diferenciación de células madre hematopoyéticas (Tanida *et al.*, 2012).
- ***Ubc*** (*Ubiquitin C*): Este gen codifica para un precursor poliubiquitina. La conjugación de los monómeros de ubiquitina o polímeros con proteínas conduce a múltiples efectos celulares, incluyendo la degradación de las proteínas, reparación del DNA, regulación del ciclo celular, modificación por medio de quinasas, endocitosis y regulación de otras rutas de señalización molecular (Nenoi *et al.*, 1998)

Como se puede observar, todos los genes que hemos destacado están relacionados con funciones celulares generales, como división celular, metabolismo, homeostasis, ubiquitinación, etc. Como ocurre con los ratones mutantes condicionales *miR-17-92* en células de Sertoli, el número de genes desregulados es muy alto (aunque en este caso es mayor, más de 2000) (Hurtado *et al.*, 2018), sin embargo, la magnitud de los cambios

5. DISCUSIÓN

en sus niveles de expresión es muy moderada (menor de dos veces en la mayoría de los casos). Como comentamos anteriormente, este perfil transcriptómico es consistente con la hipótesis aceptada de que estos miRNAs actúan como reguladores finos de grandes redes genéticas en lugar de regular a genes individuales que son esenciales en el control de rutas específicas (Han *et al.*, 2015). Esta desregulación en la expresión génica podría explicarse si consideramos que la ausencia del clúster *miR-106b-25* altera la expresión de una serie de genes diana, y que ésta alteración, a su vez, conduce a la desregulación de un número mayor de genes con los que interactúan en una misma ruta molecular. Si tenemos en cuenta esto, y que un mismo gen (o ruta molecular) puede intervenir en varios procesos fisiológicos, podemos explicar el fenotipo que muestran los testículos *miR-106b-25*^{-/-} tanto a nivel histológico como molecular. En este contexto, hemos realizado un análisis de interacción proteína-proteína con todos los genes que están desregulados, y hemos encontrado una red extensa y muy interconectada en la que se observaron varias subredes. El análisis GO de las subredes reveló la presencia de una subred central enriquecida en genes relacionados con la ubiquitinación. Interconectada con esta red encontramos otras cuatro redes: dos enriquecidas en genes relacionados con procesos que tienen lugar durante la espermatogénesis como son el ciclo celular y la formación de microtúbulos, y otras dos en procesos relacionados con la función de los miRNAs, como son el procesamiento del RNA y la traducción. En la subred de ubiquitinación detectamos que el gen *Ubc*, diana de la familia *miR-17*, tiene numerosas conexiones.

En resumen, si tenemos en cuenta el papel esencial de la ubiquitinación en multitud de procesos biológicos, es lógico suponer que la alteración en esta ruta molecular puede conducir a la perturbación de otras rutas génicas con las que interactúa, como el ciclo celular y la formación de microtúbulos. De hecho, las alteraciones en estos dos procesos pueden explicar los defectos en la espermatogénesis y el reducido número de espermatozoides observados en los testículos *miR-106b-25*^{-/-}. En estos procesos, la regulación de *Ubc* por los miembros *miR-106b* y *miR-93* de la familia *miR-17* puede jugar un papel importante, aunque no debemos de olvidar las contribuciones de otros genes diana del clúster *miR-106b-25*.

6. Conclusiones

6.1 Conclusiones

1. Tal como ocurre durante el desarrollo embrionario, los genes *Sox9* y *Sox8* son necesarios para el mantenimiento de la estructura y función de los testículos adultos. Ambos genes ejercen esta acción de manera redundante, ya que el fenotipo testicular es más severo a medida que aumenta el número de alelos *Sox* mutados.
2. En ausencia de *Sox9* y *Sox8* los túbulos seminíferos desaparecen completamente. Nuestros resultados sugieren que ambos genes mantienen la integridad de estas estructuras mediante el control de la expresión de moléculas de adhesión celular y de otros elementos estructurales como los componentes del citoesqueleto o la matriz extracelular.
3. En los testículos de ratones dobles mutantes para *Sox9* y *Sox8* las células mioides peritubulares desaparecen completamente, lo que sugiere que, como ocurre durante el desarrollo embrionario, este tipo celular conserva su dependencia original de las células de Sertoli. Por el contrario, las células de Leydig poseen una estructura y función aparentemente normales, indicando que en el testículo adulto el mantenimiento de las células de Leydig es independiente de las células de Sertoli.
4. La pérdida de los genes *Sox9* y *Sox8* en testículo adulto conduce a la transdiferenciación de las células de Sertoli en células de la granulosa y la reprogramación genética de testículo a ovario. Esta transdiferenciación afecta a las células somáticas pero no a las germinales.

6. CONCLUSIONES

5. En las células de Sertoli adultas, SOX9 y SOX8 son necesarios para el mantenimiento de la expresión de *Dmrt1* y estos factores promotores del testículo regulan negativamente a *Foxl2*.
6. Nuestros resultados indican que el proceso de transdiferenciación de las células de Sertoli en células de la granulosa en los testículos mutantes para *Sox9/8* está mediado por los altos niveles de ácido retinoico que se producen como consecuencia de la ausencia de DMRT1.
7. SOX9 y SOX8 actúan como factores anti-apoptóticos en las células de Sertoli adultas.
8. La delección del *cluster miR-17-92* específicamente en las células de Sertoli embrionarias no tiene efectos fenotípicos aparentes durante desarrollo y la función testicular.
9. Tras comparar el transcriptoma de los testículos de ratones mutantes condicionales para *miR-17-92* con el de sus controles, hemos encontrado que más de 800 genes están expresados diferencialmente. Estos genes están enriquecidos en categorías de ontología génica asociados con algunas funciones esenciales del testículo entre las que se incluyen: espermatogénesis, meiosis, formación de microtúbulos, ubiquitinación y adhesión celular.
10. Los genes que muestran expresión diferencial lo hacen con una magnitud moderada, generalmente menor de dos veces. Esta situación en la que existen muchos genes desregulados moderadamente, es coherente con la hipótesis de que los miRNAs actúan como reguladores finos de grandes redes génicas en lugar de regular a genes individuales que son esenciales en el control de rutas específicas.
11. La ablación específica del *cluster miR-17-92* en células de Sertoli provoca la desregulación de moléculas de adhesión celular presentes en los contactos celulares mediante los que se establece el “diálogo” entre células de Sertoli y células germinales, y esto a su vez, puede dar lugar a una alteración de sus transcriptomas.

12. Los genes diana del *cluster miR-17-92* no están sobre-expresados preferencialmente en testículos mutantes. Dado que el *cluster miR-17-92* se deletionó condicionalmente en las células de Sertoli embrionarias y los transcriptomas se analizaron en testículos adultos, los transcriptomas probablemente no reflejan los efectos primarios derivados de la delección de este *cluster*, sino otros efectos inducidos con posterioridad por una reacción en cadena de genes desregulados a lo largo del tiempo.
13. Los ratones mutantes para el *cluster miR-106b-25* presentan una reducción de la masa testicular y oligozoospermia, aunque son completamente fértiles.
14. Los testículos mutantes para *miR-106b-25* tienen alteraciones en el ciclo espermatogénico. Estas anomalías van acompañadas de una ralentización de la meiosis y de un aumento de la apoptosis en los espermatoцитos.
15. El análisis transcriptómico de los testículos mutantes ha puesto de manifiesto que existen 2 255 genes desregulados. Tal como ocurre con el *cluster miR-17-92* la magnitud de los cambios en sus niveles de expresión es muy moderada (menor de dos veces en la mayoría de los casos). De nuevo, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que estos miRNAs ejercen una regulación fina de grandes redes génicas.
16. Los genes expresados diferencialmente en los testículos de ratones mutantes para *miR-106b-25* pueden ser agrupados en 3 categorías generales, según su función: 1) ciclo celular y reproducción, 2) formación de microtúbulos y 3) ubiquitinación y catabolismo. Alteraciones en estas funciones testiculares pueden explicar el fenotipo de los testículos mutantes.
17. Entre los genes que están sobre-expresados en los testículos mutantes y que son diana para *miR-106b* y *miR-93*, hemos identificado el gen *Ubc*. Dado el papel esencial de la ubiquitinación en multitud de procesos biológicos, y sin olvidar la posible contribución de otros genes diana, podemos proponer que el fenotipo mostrado por los ratones mutantes para *miR-106b-25* puede deberse en parte a la desregulación de *Ubc*.

Conclusions

- Like during the embryonic stages of development, the *Sox9* and *Sox8* genes are needed to maintain the structure and function of the adult testes. Both genes exert this action in a redundant manner, as the testicular phenotype becomes more severe as the number of mutated *Sox* alleles increases.
- In the absence of *Sox9* and *Sox8* the seminiferous tubules disappear completely. Our results suggest that both genes maintain the integrity of these structures by controlling the expression of cell adhesion molecules and other structural elements such as the cytoskeleton components or the extracellular matrix.
- In the testes of mice mutant for both *Sox9* and *Sox8*, the peritubular myoid cells disappear completely, suggesting that, as observed during embryonic development, this cell type retains its original dependence on Sertoli cells. In contrast, Leydig cells have an apparently normal structure and function, indicating that in the adult testis the maintenance of Leydig cells is independent of Sertoli cells.
- The loss of the *Sox9* and *Sox8* genes in the adult testis leads to the transdifferentiation of Sertoli cells into granulosa cells and testis-to-ovary genetic reprogramming. This transdifferentiation affects the somatic but not germ cells.
- In adult Sertoli cells, SOX9 and SOX8 are necessary for the maintenance of *Dmrt1* expression and these testicular promoting factors negatively regulate *Foxl2*.
- Our results indicate that the transdifferentiation process of Sertoli cells into granulosa cells in the mutant testis for *Sox9/8* is mediated by the high levels of retinoic acid produced as a result of the absence of DMRT1.
- SOX9 and SOX8 act as anti-apoptotic factors in adult Sertoli cells.

- The deletion of the *miR-17-92* cluster specifically in embryonic Sertoli cells has no apparent phenotypic effects during testis development and function.
- By comparing the transcriptome of testes of mice mutant for *miR-17-92* with that of control animals, we found that more than 800 genes were differently expressed. These genes are enriched in gene ontology categories associated with some essential testicular functions including: spermatogenesis, meiosis, microtubule formation, ubiquitination, and cell adhesion.
- Genes that show differential expression do so at a moderate magnitude, usually less than two fold. This situation, in which many moderately deregulated genes exist, is consistent with the hypothesis that miRNAs act as fine regulators of large gene networks rather than regulating individual genes that are essential in controlling specific pathways.
- The specific ablation of the *miR-17-92* cluster in Sertoli cells results in the deregulation of cell adhesion molecules present in the cell contacts by which the “cross-talk” between Sertoli cells and germ cells is established, and this in turn can alter their transcriptomes.
- Most of the target genes of *miR-17-92* are not overexpressed in mutant testes. Since this cluster was conditionally deleted in embryonic Sertoli cells and the transcripts were analyzed in adult testes, this transcriptome probably do not reflect the primary effects derived from the deletion of this cluster, but other effects induced later by a chain reaction of genes deregulated over time.
- Mice mutant for the *miR-106b-25* cluster show a reduction in testis mass and oligozoospermia, although they are fully fertile.
- The *miR-106b-25* mutant testes showed an altered spermatogenic cycle. These abnormalities are accompanied by a slowing down of meiosis and an increase in apoptosis in the sperm cells.
- Transcriptomic analysis of the mutant testes showed that 2255 genes were deregulated. As observed in the *miR-17-92* cluster, the

6. CONCLUSIONES

magnitude of the expression level change is quite moderate. Again, our results support the hypothesis that these miRNAs exert a fine regulation of large gene networks.

- Differentially expressed genes in the testes of mice mutant for *miR-106b-25* can be grouped into three general categories, according to their function: 1) cell cycle and reproduction, 2) microtubule processes and 3) ubiquitination and catabolism. Alterations in these testicular functions can explain the phenotype of the mutant testes.
- Among the genes that are both overexpressed in the mutant testes and targets for the *miR-106b* and *miR-93*, we have identified the *Ubc* gene. Given the essential role of ubiquitination in many biological processes, and without ruling out the possible contribution of other target genes, we suggest that the phenotype shown by the mice mutant for *miR-106b-25* may be due in part to the deregulation of *Ubc*.

A. Apéndices

A.1 Asignación de genes a tipos celulares

```
1 #calcula los todos positivos de cada tipo celular
2
3 #Sgonia
4 conSgonia <- makeContrasts(
5   Sgonia.Ser = spermatogonia - sertoli,
6   Sgonia.Scyte = spermatogonia - spermatocytes,
7   Sgonia.Stids = spermatogonia - spermatids,
8   Sgonia.Szoa = spermatogonia - spermatozoa,
9   levels = design)
10
11 anov <- glmQLFTest(fit, contrast=conSgonia)
12
13 lrt_out= topTags(anov,n=100000)
14
15 write.table(lrt_out, file='tipos celulares spermatogonia.txt', sep =
16   "\t",row.names=F) #los guarda en un archivo
17
18 spermatogoniaGC = read.table("tipos celulares spermatogonia.txt",
19   sep="\t", header=T) #los guarda en una variable antes de
20   machacar lrt_out en el siguiente tipo calular
21
22 spermatogonia_pos <- spermatogoniaGC[spermatogoniaGC$
23   logFC.Sgonia.Ser >= 0 & spermatogoniaGC$logFC.Sgonia.Scyte >= 0
24   & spermatogoniaGC$logFC.Sgonia.Stids >=0 & spermatogoniaGC$
25   logFC.Sgonia.Szoa >=0 & spermatogoniaGC$FDR <= 0.05,] #todos
26   positivos
27
28 write.table(spermatogonia_pos, file="spermatogonia_pos",sep="\t",
29   row.names=F)
30
31 #Scyte
32 conScyte <- makeContrasts(
33   Scyte.Ser = spermatocytes - sertoli,
34   Scyte.Sgonia = spermatocytes - spermatogonia,
35   Scyte.Stids = spermatocytes - spermatids,
36   Scyte.Szoa = spermatocytes - spermatozoa,
```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
30 levels = design)
31
32 anov <- glmQLFTest(fit, contrast=conScyte)
33
34 lrt_out= topTags(anov,n=100000)
35
36 write.table(lrt_out, file='tipos_celulares_spermatocytes.txt', sep =
  "\t",row.names=F)
37
38 spermatocytesGC = read.table("tipos_celulares_spermatocytes.txt",
  sep="\t", header=T)
39
40
41 spermatocytes_pos <- spermatocytesGC[spermatocytesGC$logFC.Scyte.Ser
  >= 0 & spermatocytesGC$logFC.Scyte.Sgonia >= 0 &
  spermatocytesGC$logFC.Scyte.Stids >=0 & spermatogoniaGC$
  logFC.Scyte.Szoa >=0 & spermatocytesGC$FDR <= 0.05,]
42
43 write.table(spermatocytes_pos, file="spermatocytes_pos",sep="\t",
  row.names=F)
44
45 #Stids
46 conStids <- makeContrasts(
47 Stids.Ser = spermatids - sertoli,
48 Stids.Scyte = spermatids - spermatocytes,
49 Stids.Sgonia = spermatids - spermatogonia,
50 Stids.Szoa = spermatids - spermatozoa,
51 levels = design)
52
53 anov <- glmQLFTest(fit, contrast=conStids)
54
55 lrt_out= topTags(anov,n=100000)
56
57 write.table(lrt_out, file='tipos_celulares_spermatids.txt', sep = "\t"
  ",row.names=F)
58
59 spermatidsGC = read.table("tipos_celulares_spermatids.txt", sep="\t"
  , header=T)
60
61
62 spermatids_pos <- spermatidsGC[spermatidsGC$logFC.Stids.Ser >= 0 &
  spermatidsGC$logFC.Stids.Scyte >= 0 & spermatidsGC$
  logFC.Stids.Sgonia >=0 & spermatogoniaGC$logFC.Stids.Szoa >=0 &
  spermatidsGC$FDR <= 0.05,]
63
64 write.table(spermatids_pos, file="spermatids_pos",sep="\t",
  row.names=F)
65
66 #Szoa
67 conSzoa <- makeContrasts(
68 Szoa.Ser = spermatozoa - sertoli,
69 Szoa.Scyte = spermatozoa - spermatocytes,
```


A.1. ASIGNACIÓN DE GENES A TIPOS CELULARES

```
70 Szoa.Stids = spermatozoa - spermatids ,
71 Szoa.Sgonia = spermatozoa - spermatogonia ,
72 levels = design)
73
74 anov <- glmQLFTest(fit, contrast=conSzoa)
75
76 lrt_out= topTags(anov,n=100000)
77
78 write.table(lrt_out, file='tipos_celulares_spermatozoa.txt', sep = "\t",row.names=F) #los guarda en un archivo
79
80 spermatozoaGC = read.table("tipos_celulares_spermatozoa.txt", sep="\t", header=T) #los guarda en una variable antes de machacar lrt_out en el siguiente tipo calcular
81
82
83 spermatozoa_pos <- spermatozoaGC[spermatozoaGC$logFC.Szoa.Ser >= 0 & spermatozoaGC$logFC.Szoa.Scyte >= 0 & spermatozoaGC$logFC.Szoa.Stids >=0 & spermatogoniaGC$logFC.Szoa.Sgonia >=0 & spermatozoaGC$FDR <= 0.05,] #todos positivos
84
85 write.table(spermatozoa_pos, file="spermatozoa_pos",sep="\t", row.names=F)
86
87 #listas de genes
88 spermatogonia_pos_list = spermatogonia_pos[,"GeneID"]
89 spermatocytes_pos_list = spermatocytes_pos[,"GeneID"]
90 spermatids_pos_list = spermatids_pos[,"GeneID"]
91 spermatozoa_pos_list = spermatozoa_pos[,"GeneID"]
92
93 #lee la lista de nuestros genes expresados diferencialmente
94 DE_genes= read.table("DE_M1_Tes_GML_sig.txt", sep="\t", header=T)
95 DE_genes_list <- DE_genes[,"GeneID"]
96
97 #calcula las intersecciones con nuestra lista
98 DE_spermatogonia_pos_list = intersect(spermatogonia_pos_list,DE_genes_list)
99 DE_spermatocytes_pos_list = intersect(spermatocytes_pos_list,DE_genes_list)
100 DE_spermatids_pos_list = intersect(spermatids_pos_list,DE_genes_list)
101 DE_spermatozoa_pos_list = intersect(spermatozoa_pos_list,DE_genes_list)
102
103 #guardarlos en archivos
104 write.table(file="DE_spermatogonia_pos_list", DE_spermatogonia_pos_list, row.names = FALSE, quote = FALSE)
105 write.table(file="DE_spermatocytes_pos_list", DE_spermatocytes_pos_list, row.names = FALSE, quote = FALSE)
106 write.table(file="DE_spermatids_pos_list", DE_spermatids_pos_list, row.names = FALSE, quote = FALSE)
```

```
107 write.table(file="DE_spermatozoa_pos_list", DE_spermatozoa_pos_list,
              row.names = FALSE, quote = FALSE)
```

A.2 Generación de las tablas de genes para el *Circos plot*

```
1 #load library rjson before sourcing the script
2 #install.packages("rjson")
3 library("rjson")
4
5 #read data
6 DE_M1 <- read.table("DE_M1_Tes_GML_sig.txt",head=TRUE)
7 DE_M1_ordered <- DE_M1[order(DE_M1$logFC, decreasing = TRUE),]
8
9 DE_sertoli_list <- read.table("DE_sertoli_list")
10 DE_spermatids_list <- read.table("DE_spermatids_pos_list")
11 DE_spermatocytes_list <- read.table("DE_spermatocytes_pos_list")
12 DE_spermatogonia_list <- read.table("DE_spermatogonia_pos_list")
13 DE_spermatozoa_list <- read.table("DE_spermatozoa_pos_list")
14
15 colnames(DE_sertoli_list) <- "GeneID"
16 DE_sertoli_merged <- merge(DE_M1,DE_sertoli_list,by.x = "GeneID",
                             by.y = "GeneID")
17 DE_sertoli_merged <- DE_sertoli_merged[order(DE_sertoli_merged$logFC
                                                , decreasing = TRUE),]
18
19 colnames(DE_spermatids_list) <- "GeneID"
20 DE_spermatids_merged <- merge(DE_M1,DE_spermatids_list,by.x = "
    GeneID", by.y = "GeneID")
21 DE_spermatids_merged <- DE_spermatids_merged[order(DE_spermatids_
    merged$logFC, decreasing = TRUE),]
22
23 colnames(DE_spermatocytes_list) <- "GeneID"
24 DE_spermatocytes_merged <- merge(DE_M1,DE_spermatocytes_list,by.x =
    "GeneID", by.y = "GeneID")
25 DE_spermatocytes_merged <- DE_spermatocytes_merged[order(DE_
    spermatocytes_merged$logFC, decreasing = TRUE),]
26
27 colnames(DE_spermatogonia_list) <- "GeneID"
28 DE_spermatogonia_merged <- merge(DE_M1,DE_spermatogonia_list,by.x =
    "GeneID", by.y = "GeneID")
29 DE_spermatogonia_merged <- DE_spermatogonia_merged[order(DE_
    spermatogonia_merged$logFC, decreasing = TRUE),]
30
31 colnames(DE_spermatozoa_list) <- "GeneID"
32 DE_spermatozoa_merged <- merge(DE_M1,DE_spermatozoa_list,by.x = "
    GeneID", by.y = "GeneID")
```

A.2. TABLAS PARA *CIRCOS PLOT*

```
33 DE_spermatozoa_merged <- DE_spermatozoa_merged[order(DE_spermatozoa_
    merged$logFC, decreasing = TRUE),]
34
35 #M1 link table
36 logFC <- DE_M1["logFC"]
37 fusion <- DE_M1["GeneID"]
38 colnames(fusion) <- "fusion"
39 temp <- data.frame(logFC,fusion)
40 temp <- temp[order(temp$logFC, decreasing = TRUE),]
41 g1chr <- rep("M1 mutants", 809)
42 g1start <- 0:808
43 g1end <- 0:808+1
44 g1name <- temp$fusion
45 #colnames(g1name) <- "g1name"
46 M1_links <- data.frame(temp,g1chr,g1start,g1end,g1name)
47
48 #Sertoli link table
49 temp <- DE_M1[DE_M1$GeneID %in% DE_sertoli_merged$GeneID,c("GeneID",
    "logFC")]
50 colnames(temp) <- c("fusion","logFC")
51 temp <- temp[order(temp$logFC, decreasing = TRUE),]
52 g2chr <- rep("Sertoli", 55)
53 g2start <- 0:54
54 g2end <- 0:54+1
55 g2name <- temp$fusion
56 sertoli_links <- data.frame(temp,g2chr,g2start,g2end,g2name)
57
58 #Spermatogonia link table
59 temp <- DE_M1[DE_M1$GeneID %in% DE_spermatogonia_merged$GeneID,c("
    GeneID","logFC")]
60 colnames(temp) <- c("fusion","logFC")
61 temp <- temp[order(temp$logFC, decreasing = TRUE),]
62 g2chr <- rep("Spermatogonia", 87)
63 g2start <- 0:86
64 g2end <- 0:86+1
65 g2name <- temp$fusion
66 spermatogonia_links <- data.frame(temp,g2chr,g2start,g2end,g2name)
67
68 #Spermatocytes link table
69 temp <- DE_M1[DE_M1$GeneID %in% DE_spermatocytes_merged$GeneID,c("
    GeneID","logFC")]
70 colnames(temp) <- c("fusion","logFC")
71 temp <- temp[order(temp$logFC, decreasing = TRUE),]
72 g2chr <- rep("Spermatocytes", 203)
73 g2start <- 0:202
74 g2end <- 0:202+1
75 g2name <- temp$fusion
76 spermatocytes_links <- data.frame(temp,g2chr,g2start,g2end,g2name)
77
78 #Spermatids link table
79 temp <- DE_M1[DE_M1$GeneID %in% DE_spermatids_merged$GeneID,c("
    GeneID","logFC")]
```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
80 colnames(temp) <- c("fusion","logFC")
81 temp <- temp[order(temp$logFC, decreasing = TRUE),]
82 g2chr <- rep("Spermatids", 328)
83 g2start <- 0:327
84 g2end <- 0:327+1
85 g2name <- temp$fusion
86 spermatids_links <- data.frame(temp,g2chr,g2start,g2end,g2name)
87
88 #Spermatozoa link table
89 temp <- DE_M1[DE_M1$GeneID %in% DE_spermatozoa_merged$GeneID,c("
  GeneID","logFC")]
90 colnames(temp) <- c("fusion","logFC")
91 temp <- temp[order(temp$logFC, decreasing = TRUE),]
92 g2chr <- rep("Spermatozoa", 135)
93 g2start <- 0:134
94 g2end <- 0:134+1
95 g2name <- temp$fusion
96 spermatozoa_links <- data.frame(temp,g2chr,g2start,g2end,g2name)
97
98 #M1-sertoli links
99
100 M1_sertoli_links <- merge(M1_links,subset(sertoli_links, select = -
  logFC),by = "fusion")
101 M1_sertoli_links <- M1_sertoli_links[order(M1_sertoli_links$logFC,
  decreasing = TRUE),]
102
103 #M1-spermatogonia links
104
105 M1_spermatogonia_links <- merge(M1_links,subset(spermatogonia_links,
  select = -logFC),by = "fusion")
106 M1_spermatogonia_links <- M1_spermatogonia_links[order(M1_
  spermatogonia_links$logFC, decreasing = TRUE),]
107
108 #M1-spermatocytes links
109
110 M1_spermatocytes_links <- merge(M1_links,subset(spermatocytes_links,
  select = -logFC),by = "fusion")
111 M1_spermatocytes_links <- M1_spermatocytes_links[order(M1_
  spermatocytes_links$logFC, decreasing = TRUE),]
112
113 #M1-spermatids links
114
115 M1_spermatids_links <- merge(M1_links,subset(spermatids_links,
  select = -logFC),by = "fusion")
116 M1_spermatids_links <- M1_spermatids_links[order(M1_spermatids_links
  $logFC, decreasing = TRUE),]
117
118 #M1-spermatozoa links
119
120 M1_spermatozoa_links <- merge(M1_links,subset(spermatozoa_links,
  select = -logFC),by = "fusion")
```

A.2. TABLAS PARA *CIRCOS PLOT*

```
121 M1_spermatozoa_links <- M1_spermatozoa_links[order(M1_spermatozoa_
    links$logFC, decreasing = TRUE),]
122
123 #save json files removing logFC
124
125 temp <- subset(M1_sertoli_links, select = -logFC)
126 temp.json <- toJSON(unname(split(temp, 1:nrow(temp))))
127 write(temp.json, "M1_sertoli_links")
128
129 temp <- subset(M1_spermatogonia_links, select = -logFC)
130 temp.json <- toJSON(unname(split(temp, 1:nrow(temp))))
131 write(temp.json, "M1_spermatogonia_links")
132
133 temp <- subset(M1_spermatocytes_links, select = -logFC)
134 temp.json <- toJSON(unname(split(temp, 1:nrow(temp))))
135 write(temp.json, "M1_spermatocytes_links")
136
137 temp <- subset(M1_spermatids_links, select = -logFC)
138 temp.json <- toJSON(unname(split(temp, 1:nrow(temp))))
139 write(temp.json, "M1_spermatids_links")
140
141 temp <- subset(M1_spermatozoa_links, select = -logFC)
142 temp.json <- toJSON(unname(split(temp, 1:nrow(temp))))
143 write(temp.json, "M1_spermatozoa_links")
144
145 #heatmap tables
146
147 M1_heat <- data.frame(M1_links$g1chr, M1_links$g1start, M1_links$g1end
    , M1_links$g1name, M1_links$logFC)
148 colnames(M1_heat) <- c("chr", "start", "end", "name", "value")
149 M1_heat_json <- toJSON(unname(split(M1_heat, 1:nrow(M1_heat))))
150 write(M1_heat_json, "M1_heat_json")
151
152 sertoli_heat <- data.frame(sertoli_links$g2chr, sertoli_links$g2start
    , sertoli_links$g2end, sertoli_links$g2name, sertoli_links$logFC)
153 colnames(sertoli_heat) <- c("chr", "start", "end", "name", "value")
154 sertoli_heat_json <- toJSON(unname(split(sertoli_heat, 1:nrow(
    sertoli_heat))))
155 write(sertoli_heat_json, "sertoli_heat_json")
156
157 spermatogonia_heat <- data.frame(spermatogonia_links$g2chr,
    spermatogonia_links$g2start, spermatogonia_links$g2end,
    spermatogonia_links$g2name, spermatogonia_links$logFC)
158 colnames(spermatogonia_heat) <- c("chr", "start", "end", "name", "value"
    )
159 spermatogonia_heat_json <- toJSON(unname(split(spermatogonia_heat,
    1:nrow(spermatogonia_heat))))
160 write(spermatogonia_heat_json, "spermatogonia_heat_json")
161
162 spermatocytes_heat <- data.frame(spermatocytes_links$g2chr,
    spermatocytes_links$g2start, spermatocytes_links$g2end,
    spermatocytes_links$g2name, spermatocytes_links$logFC)
```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
163 colnames(spermatocytes_heat) <- c("chr", "start", "end", "name", "value"
)
164 spermatocytes_heat_json <- toJSON(unname(split(spermatocytes_heat,
1:nrow(spermatocytes_heat))))
165 write(spermatocytes_heat_json, "spermatocytes_heat_json")
166
167 spermatids_heat <- data.frame(spermatids_links$g2chr, spermatids_
links$g2start, spermatids_links$g2end, spermatids_links$g2name,
spermatids_links$logFC)
168 colnames(spermatids_heat) <- c("chr", "start", "end", "name", "value")
169 spermatids_heat_json <- toJSON(unname(split(spermatids_heat, 1:nrow(
spermatids_heat))))
170 write(spermatids_heat_json, "spermatids_heat_json")
171
172 spermatozoa_heat <- data.frame(spermatozoa_links$g2chr, spermatozoa_
links$g2start, spermatozoa_links$g2end, spermatozoa_links$g2name,
spermatozoa_links$logFC)
173 colnames(spermatozoa_heat) <- c("chr", "start", "end", "name", "value")
174 spermatozoa_heat_json <- toJSON(unname(split(spermatozoa_heat, 1:
nrow(spermatozoa_heat))))
175 write(spermatozoa_heat_json, "spermatozoa_heat_json")
176
177 #joining all heatmaps
178 #install.packages("plyr")
179
180 library(plyr)
181
182 dfs <- list(M1_heat, sertoli_heat, spermatogonia_heat, spermatocytes_
heat, spermatids_heat, spermatozoa_heat)
183 HEAT_all <- join_all(dfs, type = "full")
184
185 HEAT_all["end"] <- HEAT_all["end"]+1 #makes the genes overlap for a
better graph
186
187 all_heat_json <- toJSON(unname(split(HEAT_all, 1:nrow(HEAT_all))))
188 write(all_heat_json, "all_heat_json")
189
190
191 # test <- M1_links[!(M1_links$fusion %in% M1_sertoli_links$fusion),]
192 # test <- test[!(test$fusion %in% M1_spermatogonia_links$fusion),]
193 # test <- test[!(test$fusion %in% M1_spermatocytes_links$fusion),]
194 # test <- test[!(test$fusion %in% M1_spermatids_links$fusion),]
195 # test <- test[!(test$fusion %in% M1_spermatozoa_links$fusion),]
196 #
197 # logFC fusion g1chr g1start glend g1name
198 # 715 2.174688 Mir7230 M1 mutants 0 1 Mir7230
199
200 #tablas de dianas
201
202 DE_mir17_tot_fin <- read.table("DE_mir17_tot_fin", header = TRUE)
203 DE_mir18_tot_fin <- read.table("DE_mir18_tot_fin", header = TRUE)
204 DE_mir19_tot_fin <- read.table("DE_mir19_tot_fin", header = TRUE)
```

```
205 DE_mir25_tot_fin <- read.table("DE_mir25_tot_fin",header = TRUE)
```

A.3 Construcción del *Circos plot*

A.3.1 Ejemplo de datos para *Heatmap*

```

1
2 var HEATMAPSpermatozoa = [ "HEATMAPSpermatozoa" , {
3     innerRadius: -20,
4     outerRadius: -35,
5     maxColor: "red",
6     minColor: "#5F5"
7
8 } ,
9
10 [{"chr": "Spermatozoa", "start": 0, "end": 1, "name": "Pik3r4", "value"
11     : 1.01337927457778},
12 {"chr": "Spermatozoa", "start": 1, "end": 2, "name": "9230102004Rik", "value"
13     : 0.959082417959323},
14 {"chr": "Spermatozoa", "start": 2, "end": 3, "name": "Slc29a3", "value"
15     : 0.846849667905751},
16 {"chr": "Spermatozoa", "start": 3, "end": 4, "name": "Rgl2", "value"
17     : 0.830521493090576},
18 {"chr": "Spermatozoa", "start": 4, "end": 5, "name": "Leng8", "value"
19     : 0.725397736208914},
20 {"chr": "Spermatozoa", "start": 5, "end": 6, "name": "Clk1", "value"
21     : 0.660599310197121},
22 {"chr": "Spermatozoa", "start": 6, "end": 7, "name": "4930412013Rik", "value"
23     : 0.654452604813785},
24 {"chr": "Spermatozoa", "start": 7, "end": 8, "name": "Srcap", "value"
25     : 0.643641525729218},
26 {"chr": "Spermatozoa", "start": 8, "end": 9, "name": "Bicd2", "value"
27     : 0.643534831758401},
28 {"chr": "Spermatozoa", "start": 9, "end": 10, "name": "Srsf11", "value"
29     : 0.593689710723022},
30 {"chr": "Spermatozoa", "start": 10, "end": 11, "name": "Ints1", "value"
31     : 0.590190147294236},
32 {"chr": "Spermatozoa", "start": 11, "end": 12, "name": "Eprs", "value"
33     : 0.57086603418389},
34 {"chr": "Spermatozoa", "start": 12, "end": 13, "name": "Cad", "value"
35     : 0.546039931235233},
36 {"chr": "Spermatozoa", "start": 13, "end": 14, "name": "Cd2ap", "value"
37     : 0.540088231276513},
38 {"chr": "Spermatozoa", "start": 14, "end": 15, "name": "Mtr", "value"
39     : 0.505998420175768},
40 {"chr": "Spermatozoa", "start": 15, "end": 16, "name": "Syne2", "value"
41     : 0.490708464423476},

```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
26 {"chr": "Spermatozoa", "start": 16, "end": 17, "name": "Kidins220", "value"  
    : 0.462922583260182},  
27 {"chr": "Spermatozoa", "start": 17, "end": 18, "name": "Rnf5", "value"  
    : 0.453636845957649},  
28 {"chr": "Spermatozoa", "start": 18, "end": 19, "name": "Ralgap1", "value"  
    : 0.441706519471914},  
29 {"chr": "Spermatozoa", "start": 19, "end": 20, "name": "Ncoa3", "value"  
    : 0.417780278998596},  
30 {"chr": "Spermatozoa", "start": 20, "end": 21, "name": "Mon2", "value"  
    : 0.332278431400647},  
31 {"chr": "Spermatozoa", "start": 21, "end": 22, "name": "Nfatc3", "value"  
    : 0.327327774959957},  
32 {"chr": "Spermatozoa", "start": 22, "end": 23, "name": "Cpog2", "value"  
    : 0.320482583323754},  
33 {"chr": "Spermatozoa", "start": 23, "end": 24, "name": "Tpr", "value"  
    : 0.311481440721985},  
34 {"chr": "Spermatozoa", "start": 24, "end": 25, "name": "Osbpl8", "value"  
    : 0.309385283125122},  
35 {"chr": "Spermatozoa", "start": 25, "end": 26, "name": "Atp9a", "value"  
    : 0.305896260292523},  
36 {"chr": "Spermatozoa", "start": 26, "end": 27, "name": "Tsc2", "value"  
    : 0.285093155015988},  
37 {"chr": "Spermatozoa", "start": 27, "end": 28, "name": "Fasn", "value"  
    : 0.28082440130684},  
38 {"chr": "Spermatozoa", "start": 28, "end": 29, "name": "Pank3", "value"  
    : 0.27586129056677},  
39 {"chr": "Spermatozoa", "start": 29, "end": 30, "name": "Ddx6", "value"  
    : 0.266937365758897},  
40 {"chr": "Spermatozoa", "start": 30, "end": 31, "name": "Usp24", "value"  
    : -0.243400505301168},  
41 {"chr": "Spermatozoa", "start": 31, "end": 32, "name": "Herc2", "value"  
    : -0.245979930697563},  
42 {"chr": "Spermatozoa", "start": 32, "end": 33, "name": "Ccdc88c", "value"  
    : -0.249577407083659},  
43 {"chr": "Spermatozoa", "start": 33, "end": 34, "name": "Nr2c2", "value"  
    : -0.257358175854246},  
44 {"chr": "Spermatozoa", "start": 34, "end": 35, "name": "Glg1", "value"  
    : -0.258409947416267},  
45 {"chr": "Spermatozoa", "start": 35, "end": 36, "name": "Scd2", "value"  
    : -0.259589379098493},  
46 {"chr": "Spermatozoa", "start": 36, "end": 37, "name": "Fads2", "value"  
    : -0.265127999313757},  
47 {"chr": "Spermatozoa", "start": 37, "end": 38, "name": "Dync1h1", "value"  
    : -0.269648509919822},  
48 {"chr": "Spermatozoa", "start": 38, "end": 39, "name": "Ncoa2", "value"  
    : -0.274563625829196},  
49 {"chr": "Spermatozoa", "start": 39, "end": 40, "name": "4932438A13Rik", "value"  
    : -0.282232784613106},  
50 {"chr": "Spermatozoa", "start": 40, "end": 41, "name": "Dennd5b", "value"  
    : -0.286569085701795},  
51 {"chr": "Spermatozoa", "start": 41, "end": 42, "name": "Ubr3", "value"  
    : -0.288292001135309},
```


A.3. CONSTRUCCIÓN DE *CIRCOS PLOT*

```
52 {"chr": "Spermatozoa", "start": 42, "end": 43, "name": "Ralgapb", "value"  
    : -0.288892601698553},  
53 {"chr": "Spermatozoa", "start": 43, "end": 44, "name": "Helz", "value"  
    : -0.289886246487645},  
54 {"chr": "Spermatozoa", "start": 44, "end": 45, "name": "Kdm5a", "value"  
    : -0.290717769429839},  
55 {"chr": "Spermatozoa", "start": 45, "end": 46, "name": "Cltc", "value"  
    : -0.291843629710443},  
56 {"chr": "Spermatozoa", "start": 46, "end": 47, "name": "Dennd4c", "value"  
    : -0.292585776297811},  
57 {"chr": "Spermatozoa", "start": 47, "end": 48, "name": "Sf3b1", "value"  
    : -0.296587562768719},  
58 {"chr": "Spermatozoa", "start": 48, "end": 49, "name": "Akap11", "value"  
    : -0.297536458472659},  
59 {"chr": "Spermatozoa", "start": 49, "end": 50, "name": "Nf1", "value"  
    : -0.300339715531119},  
60 {"chr": "Spermatozoa", "start": 50, "end": 51, "name": "Hectd1", "value"  
    : -0.300921663901532},  
61 {"chr": "Spermatozoa", "start": 51, "end": 52, "name": "Prpf8", "value"  
    : -0.301468648587286},  
62 {"chr": "Spermatozoa", "start": 52, "end": 53, "name": "Numa1", "value"  
    : -0.302934702379849},  
63 {"chr": "Spermatozoa", "start": 53, "end": 54, "name": "Vps13b", "value"  
    : -0.312909285606541},  
64 {"chr": "Spermatozoa", "start": 54, "end": 55, "name": "Pik3c2a", "value"  
    : -0.317561977110539},  
65 {"chr": "Spermatozoa", "start": 55, "end": 56, "name": "1110037F02Rik", "  
    value": -0.318812054651102},  
66 {"chr": "Spermatozoa", "start": 56, "end": 57, "name": "Klh19", "value"  
    : -0.320329144964102},  
67 {"chr": "Spermatozoa", "start": 57, "end": 58, "name": "Abca5", "value"  
    : -0.320440972077164},  
68 {"chr": "Spermatozoa", "start": 58, "end": 59, "name": "Lrpprc", "value"  
    : -0.323504516904436},  
69 {"chr": "Spermatozoa", "start": 59, "end": 60, "name": "Acly", "value"  
    : -0.324901850989992},  
70 {"chr": "Spermatozoa", "start": 60, "end": 61, "name": "Gns", "value"  
    : -0.328106916862492},  
71 {"chr": "Spermatozoa", "start": 61, "end": 62, "name": "Mcm3ap", "value"  
    : -0.329958036549817},  
72 {"chr": "Spermatozoa", "start": 62, "end": 63, "name": "Nek9", "value"  
    : -0.329958298528764},  
73 {"chr": "Spermatozoa", "start": 63, "end": 64, "name": "Zfp518a", "value"  
    : -0.3322910292019},  
74 {"chr": "Spermatozoa", "start": 64, "end": 65, "name": "Sel11", "value"  
    : -0.33283561886092},  
75 {"chr": "Spermatozoa", "start": 65, "end": 66, "name": "Dnajc5", "value"  
    : -0.333747095097349},  
76 {"chr": "Spermatozoa", "start": 66, "end": 67, "name": "Cyb5b", "value"  
    : -0.335125683815575},  
77 {"chr": "Spermatozoa", "start": 67, "end": 68, "name": "Ranbp2", "value"  
    : -0.335756309024745},
```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
78 {"chr": "Spermatozoa", "start": 68, "end": 69, "name": "Mycbp2", "value"
    : -0.337029139534728},
79 {"chr": "Spermatozoa", "start": 69, "end": 70, "name": "Clstn1", "value"
    : -0.33835748473753},
80 {"chr": "Spermatozoa", "start": 70, "end": 71, "name": "Dopey1", "value"
    : -0.339861180885431},
81 {"chr": "Spermatozoa", "start": 71, "end": 72, "name": "Zfyve16", "value"
    : -0.340578673699948},
82 {"chr": "Spermatozoa", "start": 72, "end": 73, "name": "Lmtk2", "value"
    : -0.341377477869926},
83 {"chr": "Spermatozoa", "start": 73, "end": 74, "name": "Atpla1", "value"
    : -0.34311273236849},
84 {"chr": "Spermatozoa", "start": 74, "end": 75, "name": "Xrcc5", "value"
    : -0.344108417965724},
85 {"chr": "Spermatozoa", "start": 75, "end": 76, "name": "Hivep1", "value"
    : -0.34445349692056},
86 {"chr": "Spermatozoa", "start": 76, "end": 77, "name": "Atp2b4", "value"
    : -0.344582469879475},
87 {"chr": "Spermatozoa", "start": 77, "end": 78, "name": "Sec16a", "value"
    : -0.347167116816592},
88 {"chr": "Spermatozoa", "start": 78, "end": 79, "name": "Htt", "value"
    : -0.347325219303638},
89 {"chr": "Spermatozoa", "start": 79, "end": 80, "name": "Brwd1", "value"
    : -0.350504659013338},
90 {"chr": "Spermatozoa", "start": 80, "end": 81, "name": "Hk2", "value"
    : -0.351236977745765},
91 {"chr": "Spermatozoa", "start": 81, "end": 82, "name": "Marf1", "value"
    : -0.353436099751022},
92 {"chr": "Spermatozoa", "start": 82, "end": 83, "name": "Lrp5", "value"
    : -0.354591866028786},
93 {"chr": "Spermatozoa", "start": 83, "end": 84, "name": "Dock7", "value"
    : -0.359089880917112},
94 {"chr": "Spermatozoa", "start": 84, "end": 85, "name": "Fads1", "value"
    : -0.372773338554213},
95 {"chr": "Spermatozoa", "start": 85, "end": 86, "name": "Acaca", "value"
    : -0.372787252591731},
96 {"chr": "Spermatozoa", "start": 86, "end": 87, "name": "Gfpt1", "value"
    : -0.375322777862069},
97 {"chr": "Spermatozoa", "start": 87, "end": 88, "name": "Trappc10", "value"
    : -0.375487479063639},
98 {"chr": "Spermatozoa", "start": 88, "end": 89, "name": "Sgpp1", "value"
    : -0.378375478051331},
99 {"chr": "Spermatozoa", "start": 89, "end": 90, "name": "Ubr1", "value"
    : -0.378918479372828},
100 {"chr": "Spermatozoa", "start": 90, "end": 91, "name": "Zbtb10", "value"
    : -0.381034257225633},
101 {"chr": "Spermatozoa", "start": 91, "end": 92, "name": "Nckap1", "value"
    : -0.382060710342012},
102 {"chr": "Spermatozoa", "start": 92, "end": 93, "name": "Alkbh5", "value"
    : -0.38578544850368},
103 {"chr": "Spermatozoa", "start": 93, "end": 94, "name": "AI314180", "value"
    : -0.387050049657152},
```

A.3. CONSTRUCCIÓN DE *CIRCOS PLOT*

```
104 {"chr": "Spermatozoa", "start": 94, "end": 95, "name": "Man1a2", "value"  
    : -0.389596703943993},  
105 {"chr": "Spermatozoa", "start": 95, "end": 96, "name": "Taok1", "value"  
    : -0.391694883157819},  
106 {"chr": "Spermatozoa", "start": 96, "end": 97, "name": "Srsf5", "value"  
    : -0.395050028947013},  
107 {"chr": "Spermatozoa", "start": 97, "end": 98, "name": "Clk4", "value"  
    : -0.395958731254122},  
108 {"chr": "Spermatozoa", "start": 98, "end": 99, "name": "Cpd", "value"  
    : -0.398893230182556},  
109 {"chr": "Spermatozoa", "start": 99, "end": 100, "name": "Myo18a", "value"  
    : -0.402928565917677},  
110 {"chr": "Spermatozoa", "start": 100, "end": 101, "name": "Fam178a", "value"  
    : -0.406534808879255},  
111 {"chr": "Spermatozoa", "start": 101, "end": 102, "name": "Mpp5", "value"  
    : -0.409061323320477},  
112 {"chr": "Spermatozoa", "start": 102, "end": 103, "name": "Atg2b", "value"  
    : -0.414252112668743},  
113 {"chr": "Spermatozoa", "start": 103, "end": 104, "name": "Tbc1d1", "value"  
    : -0.42210875685553},  
114 {"chr": "Spermatozoa", "start": 104, "end": 105, "name": "Hip1r", "value"  
    : -0.427666222609629},  
115 {"chr": "Spermatozoa", "start": 105, "end": 106, "name": "Hcfc1", "value"  
    : -0.428782484450919},  
116 {"chr": "Spermatozoa", "start": 106, "end": 107, "name": "Usp9x", "value"  
    : -0.436320786770213},  
117 {"chr": "Spermatozoa", "start": 107, "end": 108, "name": "Ap1b1", "value"  
    : -0.437543913126159},  
118 {"chr": "Spermatozoa", "start": 108, "end": 109, "name": "Srsf6", "value"  
    : -0.449007817483305},  
119 {"chr": "Spermatozoa", "start": 109, "end": 110, "name": "Pcnx13", "value"  
    : -0.449180633459754},  
120 {"chr": "Spermatozoa", "start": 110, "end": 111, "name": "Rab3gap2", "value"  
    : -0.450467171008759},  
121 {"chr": "Spermatozoa", "start": 111, "end": 112, "name": "Akap81", "value"  
    : -0.455668139063245},  
122 {"chr": "Spermatozoa", "start": 112, "end": 113, "name": "Snrnp70", "value"  
    : -0.458541061998207},  
123 {"chr": "Spermatozoa", "start": 113, "end": 114, "name": "Tmub2", "value"  
    : -0.459673588908455},  
124 {"chr": "Spermatozoa", "start": 114, "end": 115, "name": "Xpo1", "value"  
    : -0.46102406584958},  
125 {"chr": "Spermatozoa", "start": 115, "end": 116, "name": "Ppp4r1l-ps", "value"  
    : -0.462335410659249},  
126 {"chr": "Spermatozoa", "start": 116, "end": 117, "name": "Mroh1", "value"  
    : -0.462785423865976},  
127 {"chr": "Spermatozoa", "start": 117, "end": 118, "name": "Gga3", "value"  
    : -0.465721420170338},  
128 {"chr": "Spermatozoa", "start": 118, "end": 119, "name": "Zcchc7", "value"  
    : -0.471046317284167},  
129 {"chr": "Spermatozoa", "start": 119, "end": 120, "name": "Aridia", "value"  
    : -0.472259009868909},
```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
130 {"chr": "Spermatozoa", "start": 120, "end": 121, "name": "Gapvd1", "value"  
    : -0.477625240738134},  
131 {"chr": "Spermatozoa", "start": 121, "end": 122, "name": "Luc7l3", "value"  
    : -0.487992665562733},  
132 {"chr": "Spermatozoa", "start": 122, "end": 123, "name": "Mia3", "value"  
    : -0.489143574276516},  
133 {"chr": "Spermatozoa", "start": 123, "end": 124, "name": "Stx16", "value"  
    : -0.490562852575217},  
134 {"chr": "Spermatozoa", "start": 124, "end": 125, "name": "Per1", "value"  
    : -0.495705397031551},  
135 {"chr": "Spermatozoa", "start": 125, "end": 126, "name": "Herc1", "value"  
    : -0.502257411722906},  
136 {"chr": "Spermatozoa", "start": 126, "end": 127, "name": "Pnistr", "value"  
    : -0.50559213252202},  
137 {"chr": "Spermatozoa", "start": 127, "end": 128, "name": "Nsmf", "value"  
    : -0.519620792751979},  
138 {"chr": "Spermatozoa", "start": 128, "end": 129, "name": "Serh1", "value"  
    : -0.523420633723882},  
139 {"chr": "Spermatozoa", "start": 129, "end": 130, "name": "Nxf1", "value"  
    : -0.5330656425341},  
140 {"chr": "Spermatozoa", "start": 130, "end": 131, "name": "Pnn", "value"  
    : -0.541553045581879},  
141 {"chr": "Spermatozoa", "start": 131, "end": 132, "name": "Elmo3", "value"  
    : -0.545471716079941},  
142 {"chr": "Spermatozoa", "start": 132, "end": 133, "name": "Pisd-ps1", "value"  
    : -0.547374852894014},  
143 {"chr": "Spermatozoa", "start": 133, "end": 134, "name": "Malat1", "value"  
    : -0.564633617635998},  
144 {"chr": "Spermatozoa", "start": 134, "end": 135, "name": "Osbpl7", "value"  
    : -0.565476784746303}]  
145 ];
```

A.3.2 Ejemplo de enlaces

```
1  
2 var LINKSpermatozoa = [ "LINKSpermatozoa" , {  
3   LinkRadius: 205,  
4   LinkFillColor: "#09C",  
5   LinkWidth: 1,  
6   displayLinkAxis: true,  
7   LinkAxisColor: "#B8B8B8",  
8   LinkAxisWidth: 0.5,  
9   LinkAxisPad: 3,  
10  displayLinkLabel: false,  
11  LinkLabelColor: "red",  
12  LinkLabelSize: 8,  
13  LinkLabelPad: 3,  
14  } ,
```

A.3. CONSTRUCCIÓN DE *CIRCOS PLOT*

```
15 [{"fusion": "9230102004Rik", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 8, "g1end": 9, "g1name": "9230102004Rik", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 0, "g2end": 1, "g2name": "9230102004Rik"}]
16 [{"fusion": "0sbpl7", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 11, "g1end": 12, "g1name": "0sbpl7", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 1, "g2end": 2, "g2name": "0sbpl7"}]
17 [{"fusion": "Slc29a3", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 21, "g1end": 22, "g1name": "Slc29a3", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 2, "g2end": 3, "g2name": "Slc29a3"}]
18 [{"fusion": "Malat1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 22, "g1end": 23, "g1name": "Malat1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 3, "g2end": 4, "g2name": "Malat1"}]
19 [{"fusion": "Leng8", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 38, "g1end": 39, "g1name": "Leng8", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 4, "g2end": 5, "g2name": "Leng8"}]
20 [{"fusion": "4930412013Rik", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 50, "g1end": 51, "g1name": "4930412013Rik", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 5, "g2end": 6, "g2name": "4930412013Rik"}]
21 [{"fusion": "Bicd2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 52, "g1end": 53, "g1name": "Bicd2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 6, "g2end": 7, "g2name": "Bicd2"}]
22 [{"fusion": "Elmo3", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 54, "g1end": 55, "g1name": "Elmo3", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 7, "g2end": 8, "g2name": "Elmo3"}]
23 [{"fusion": "Pisd-ps1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 55, "g1end": 56, "g1name": "Pisd-ps1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 8, "g2end": 9, "g2name": "Pisd-ps1"}]
24 [{"fusion": "Pnizr", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 66, "g1end": 67, "g1name": "Pnizr", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 9, "g2end": 10, "g2name": "Pnizr"}]
25 [{"fusion": "Serhl", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 68, "g1end": 69, "g1name": "Serhl", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 10, "g2end": 11, "g2name": "Serhl"}]
26 [{"fusion": "Rgl2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 74, "g1end": 75, "g1name": "Rgl2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 11, "g2end": 12, "g2name": "Rgl2"}]
27 [{"fusion": "Clk1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 78, "g1end": 79, "g1name": "Clk1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 12, "g2end": 13, "g2name": "Clk1"}]
28 [{"fusion": "Nsmf", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 81, "g1end": 82, "g1name": "Nsmf", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 13, "g2end": 14, "g2name": "Nsmf"}]
29 [{"fusion": "Rnf5", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 93, "g1end": 94, "g1name": "Rnf5", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 14, "g2end": 15, "g2name": "Rnf5"}]
30 [{"fusion": "Tmub2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 98, "g1end": 99, "g1name": "Tmub2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 15, "g2end": 16, "g2name": "Tmub2"}]
31 [{"fusion": "Stx16", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 111, "g1end": 112, "g1name": "Stx16", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 16, "g2end": 17, "g2name": "Stx16"}]
```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
32 ,{"fusion":"Snrnp70","g1chr":"M1 mutants","g1start":115,"g1end":116,
    "g1name":"Snrnp70","g2chr":"Spermatozoa","g2start":17,"g2end"
    :18,"g2name":"Snrnp70"}
33 ,{"fusion":"Luc713","g1chr":"M1 mutants","g1start":121,"g1end":122,"
    g1name":"Luc713","g2chr":"Spermatozoa","g2start":18,"g2end":19,"
    g2name":"Luc713"}
34 ,{"fusion":"Akap81","g1chr":"M1 mutants","g1start":132,"g1end":133,"
    g1name":"Akap81","g2chr":"Spermatozoa","g2start":19,"g2end":20,"
    g2name":"Akap81"}
35 ,{"fusion":"Gga3","g1chr":"M1 mutants","g1start":201,"g1end":202,"
    g1name":"Gga3","g2chr":"Spermatozoa","g2start":20,"g2end":21,"
    g2name":"Gga3"}
36 ,{"fusion":"Nxf1","g1chr":"M1 mutants","g1start":211,"g1end":212,"
    g1name":"Nxf1","g2chr":"Spermatozoa","g2start":21,"g2end":22,"
    g2name":"Nxf1"}
37 ,{"fusion":"Srsf5","g1chr":"M1 mutants","g1start":221,"g1end":222,"
    g1name":"Srsf5","g2chr":"Spermatozoa","g2start":22,"g2end":23,"
    g2name":"Srsf5"}
38 ,{"fusion":"Per1","g1chr":"M1 mutants","g1start":235,"g1end":236,"
    g1name":"Per1","g2chr":"Spermatozoa","g2start":23,"g2end":24,"
    g2name":"Per1"}
39 ,{"fusion":"Srsf11","g1chr":"M1 mutants","g1start":239,"g1end":240,"
    g1name":"Srsf11","g2chr":"Spermatozoa","g2start":24,"g2end":25,"
    g2name":"Srsf11"}
40 ,{"fusion":"Pnn","g1chr":"M1 mutants","g1start":242,"g1end":243,"
    g1name":"Pnn","g2chr":"Spermatozoa","g2start":25,"g2end":26,"
    g2name":"Pnn"}
41 ,{"fusion":"Zcchc7","g1chr":"M1 mutants","g1start":271,"g1end":272,"
    g1name":"Zcchc7","g2chr":"Spermatozoa","g2start":26,"g2end":27,"
    g2name":"Zcchc7"}
42 ,{"fusion":"Ppp4r1l-ps","g1chr":"M1 mutants","g1start":276,"g1end"
    :277,"g1name":"Ppp4r1l-ps","g2chr":"Spermatozoa","g2start":27,"
    g2end":28,"g2name":"Ppp4r1l-ps"}
43 ,{"fusion":"Clk4","g1chr":"M1 mutants","g1start":287,"g1end":288,"
    g1name":"Clk4","g2chr":"Spermatozoa","g2start":28,"g2end":29,"
    g2name":"Clk4"}
44 ,{"fusion":"Srsf6","g1chr":"M1 mutants","g1start":307,"g1end":308,"
    g1name":"Srsf6","g2chr":"Spermatozoa","g2start":29,"g2end":30,"
    g2name":"Srsf6"}
45 ,{"fusion":"Tbc1d1","g1chr":"M1 mutants","g1start":415,"g1end":416,"
    g1name":"Tbc1d1","g2chr":"Spermatozoa","g2start":30,"g2end":31,"
    g2name":"Tbc1d1"}
46 ,{"fusion":"Gfpt1","g1chr":"M1 mutants","g1start":420,"g1end":421,"
    g1name":"Gfpt1","g2chr":"Spermatozoa","g2start":31,"g2end":32,"
    g2name":"Gfpt1"}
47 ,{"fusion":"Atg2b","g1chr":"M1 mutants","g1start":424,"g1end":425,"
    g1name":"Atg2b","g2chr":"Spermatozoa","g2start":32,"g2end":33,"
    g2name":"Atg2b"}
48 ,{"fusion":"Ap1b1","g1chr":"M1 mutants","g1start":432,"g1end":433,"
    g1name":"Ap1b1","g2chr":"Spermatozoa","g2start":33,"g2end":34,"
    g2name":"Ap1b1"}
```

A.3. CONSTRUCCIÓN DE *CIRCOS PLOT*

```
49 ,{"fusion": "Pcnx13", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 434, "g1end": 435, "
    g1name": "Pcnx13", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 34, "g2end": 35, "
    g2name": "Pcnx13"}
50 ,{"fusion": "Arid1a", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 437, "g1end": 438, "
    g1name": "Arid1a", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 35, "g2end": 36, "
    g2name": "Arid1a"}
51 ,{"fusion": "Mania2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 442, "g1end": 443, "
    g1name": "Mania2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 36, "g2end": 37, "
    g2name": "Mania2"}
52 ,{"fusion": "Mpp5", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 454, "g1end": 455, "
    g1name": "Mpp5", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 37, "g2end": 38, "
    g2name": "Mpp5"}
53 ,{"fusion": "Mroh1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 461, "g1end": 462, "
    g1name": "Mroh1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 38, "g2end": 39, "
    g2name": "Mroh1"}
54 ,{"fusion": "Myo18a", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 476, "g1end": 477, "
    g1name": "Myo18a", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 39, "g2end": 40, "
    g2name": "Myo18a"}
55 ,{"fusion": "Eprs", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 485, "g1end": 486, "
    g1name": "Eprs", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 40, "g2end": 41, "
    g2name": "Eprs"}
56 ,{"fusion": "Brwd1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 489, "g1end": 490, "
    g1name": "Brwd1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 41, "g2end": 42, "
    g2name": "Brwd1"}
57 ,{"fusion": "Mia3", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 491, "g1end": 492, "
    g1name": "Mia3", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 42, "g2end": 43, "
    g2name": "Mia3"}
58 ,{"fusion": "Rab3gap2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 493, "g1end":
    :494, "g1name": "Rab3gap2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 43, "
    g2end": 44, "g2name": "Rab3gap2"}
59 ,{"fusion": "Xpo1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 494, "g1end": 495, "
    g1name": "Xpo1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 44, "g2end": 45, "
    g2name": "Xpo1"}
60 ,{"fusion": "Ncoa3", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 499, "g1end": 500, "
    g1name": "Ncoa3", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 45, "g2end": 46, "
    g2name": "Ncoa3"}
61 ,{"fusion": "Srcap", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 501, "g1end": 502, "
    g1name": "Srcap", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 46, "g2end": 47, "
    g2name": "Srcap"}
62 ,{"fusion": "Cpd", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 508, "g1end": 509, "
    g1name": "Cpd", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 47, "g2end": 48, "
    g2name": "Cpd"}
63 ,{"fusion": "Tpr", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 509, "g1end": 510, "
    g1name": "Tpr", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 48, "g2end": 49, "
    g2name": "Tpr"}
64 ,{"fusion": "Gapvd1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 514, "g1end": 515, "
    g1name": "Gapvd1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 49, "g2end": 50, "
    g2name": "Gapvd1"}
65 ,{"fusion": "Hivep1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 518, "g1end": 519, "
    g1name": "Hivep1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 50, "g2end": 51, "
    g2name": "Hivep1"}
```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
66 ,{"fusion": "Nek9", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 519, "g1end": 520, "
    g1name": "Nek9", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 51, "g2end": 52, "
    g2name": "Nek9"}
67 ,{"fusion": "Copg2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 521, "g1end": 522, "
    g1name": "Copg2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 52, "g2end": 53, "
    g2name": "Copg2"}
68 ,{"fusion": "Hk2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 544, "g1end": 545, "
    g1name": "Hk2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 53, "g2end": 54, "
    g2name": "Hk2"}
69 ,{"fusion": "Kidins220", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 554, "g1end":
    : 555, "g1name": "Kidins220", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 54, "
    g2end": 55, "g2name": "Kidins220"}
70 ,{"fusion": "Taok1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 555, "g1end": 556, "
    g1name": "Taok1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 55, "g2end": 56, "
    g2name": "Taok1"}
71 ,{"fusion": "Zbtb10", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 557, "g1end": 558, "
    g1name": "Zbtb10", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 56, "g2end": 57, "
    g2name": "Zbtb10"}
72 ,{"fusion": "Nckap1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 558, "g1end": 559, "
    g1name": "Nckap1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 57, "g2end": 58, "
    g2name": "Nckap1"}
73 ,{"fusion": "Htt", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 564, "g1end": 565, "
    g1name": "Htt", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 58, "g2end": 59, "
    g2name": "Htt"}
74 ,{"fusion": "Atp2b4", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 566, "g1end": 567, "
    g1name": "Atp2b4", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 59, "g2end": 60, "
    g2name": "Atp2b4"}
75 ,{"fusion": "Nfatc3", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 571, "g1end": 572, "
    g1name": "Nfatc3", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 60, "g2end": 61, "
    g2name": "Nfatc3"}
76 ,{"fusion": "Trappc10", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 573, "g1end":
    : 574, "g1name": "Trappc10", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 61, "
    g2end": 62, "g2name": "Trappc10"}
77 ,{"fusion": "Numa1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 574, "g1end": 575, "
    g1name": "Numa1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 62, "g2end": 63, "
    g2name": "Numa1"}
78 ,{"fusion": "Cad", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 580, "g1end": 581, "
    g1name": "Cad", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 63, "g2end": 64, "
    g2name": "Cad"}
79 ,{"fusion": "Mtr", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 582, "g1end": 583, "
    g1name": "Mtr", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 64, "g2end": 65, "
    g2name": "Mtr"}
80 ,{"fusion": "Dock7", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 583, "g1end": 584, "
    g1name": "Dock7", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 65, "g2end": 66, "
    g2name": "Dock7"}
81 ,{"fusion": "Hcfc1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 586, "g1end": 587, "
    g1name": "Hcfc1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 66, "g2end": 67, "
    g2name": "Hcfc1"}
82 ,{"fusion": "Dopey1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 587, "g1end": 588, "
    g1name": "Dopey1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 67, "g2end": 68, "
    g2name": "Dopey1"}
```


A.3. CONSTRUCCIÓN DE *CIRCOS PLOT*

```
83 ,{"fusion": "Osbp18", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 590, "g1end": 591, "
    g1name": "Osbp18", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 68, "g2end": 69, "
    g2name": "Osbp18"}
84 ,{"fusion": "Acaca", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 593, "g1end": 594, "
    g1name": "Acaca", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 69, "g2end": 70, "
    g2name": "Acaca"}
85 ,{"fusion": "Ralgapa1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 595, "g1end":
    :596, "g1name": "Ralgapa1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 70, "
    g2end": 71, "g2name": "Ralgapa1"}
86 ,{"fusion": "Clstn1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 598, "g1end": 599, "
    g1name": "Clstn1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 71, "g2end": 72, "
    g2name": "Clstn1"}
87 ,{"fusion": "Pik3r4", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 601, "g1end": 602, "
    g1name": "Pik3r4", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 72, "g2end": 73, "
    g2name": "Pik3r4"}
88 ,{"fusion": "Sgpp1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 604, "g1end": 605, "
    g1name": "Sgpp1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 73, "g2end": 74, "
    g2name": "Sgpp1"}
89 ,{"fusion": "Ubr1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 605, "g1end": 606, "
    g1name": "Ubr1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 74, "g2end": 75, "
    g2name": "Ubr1"}
90 ,{"fusion": "Hip1r", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 607, "g1end": 608, "
    g1name": "Hip1r", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 75, "g2end": 76, "
    g2name": "Hip1r"}
91 ,{"fusion": "Ncoa2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 608, "g1end": 609, "
    g1name": "Ncoa2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 76, "g2end": 77, "
    g2name": "Ncoa2"}
92 ,{"fusion": "Marf1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 611, "g1end": 612, "
    g1name": "Marf1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 77, "g2end": 78, "
    g2name": "Marf1"}
93 ,{"fusion": "Lrprrc", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 613, "g1end": 614, "
    g1name": "Lrprrc", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 78, "g2end": 79, "
    g2name": "Lrprrc"}
94 ,{"fusion": "Cyb5b", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 620, "g1end": 621, "
    g1name": "Cyb5b", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 79, "g2end": 80, "
    g2name": "Cyb5b"}
95 ,{"fusion": "Mcm3ap", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 622, "g1end": 623, "
    g1name": "Mcm3ap", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 80, "g2end": 81, "
    g2name": "Mcm3ap"}
96 ,{"fusion": "Mycbp2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 625, "g1end": 626, "
    g1name": "Mycbp2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 81, "g2end": 82, "
    g2name": "Mycbp2"}
97 ,{"fusion": "Syne2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 626, "g1end": 627, "
    g1name": "Syne2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 82, "g2end": 83, "
    g2name": "Syne2"}
98 ,{"fusion": "Sec16a", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 635, "g1end": 636, "
    g1name": "Sec16a", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 83, "g2end": 84, "
    g2name": "Sec16a"}
99 ,{"fusion": "Cd2ap", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 651, "g1end": 652, "
    g1name": "Cd2ap", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 84, "g2end": 85, "
    g2name": "Cd2ap"}
```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
100 ,{"fusion": "Dnajc5", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 652, "g1end": 653, "
    g1name": "Dnajc5", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 85, "g2end": 86, "
    g2name": "Dnajc5"}
101 ,{"fusion": "Prpf8", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 656, "g1end": 657, "
    g1name": "Prpf8", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 86, "g2end": 87, "
    g2name": "Prpf8"}
102 ,{"fusion": "Fam178a", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 657, "g1end": 658, "
    g1name": "Fam178a", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 87, "g2end"
    : 88, "g2name": "Fam178a"}
103 ,{"fusion": "Atp1a1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 659, "g1end": 660, "
    g1name": "Atp1a1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 88, "g2end": 89, "
    g2name": "Atp1a1"}
104 ,{"fusion": "Abca5", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 660, "g1end": 661, "
    g1name": "Abca5", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 89, "g2end": 90, "
    g2name": "Abca5"}
105 ,{"fusion": "Acly", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 664, "g1end": 665, "
    g1name": "Acly", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 90, "g2end": 91, "
    g2name": "Acly"}
106 ,{"fusion": "1110037F02Rik", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 665, "g1end
    : 666, "g1name": "1110037F02Rik", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start"
    : 91, "g2end": 92, "g2name": "1110037F02Rik"}
107 ,{"fusion": "Dennd4c", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 667, "g1end": 668, "
    g1name": "Dennd4c", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 92, "g2end"
    : 93, "g2name": "Dennd4c"}
108 ,{"fusion": "Zfyve16", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 669, "g1end": 670, "
    g1name": "Zfyve16", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 93, "g2end"
    : 94, "g2name": "Zfyve16"}
109 ,{"fusion": "Mon2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 671, "g1end": 672, "
    g1name": "Mon2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 94, "g2end": 95, "
    g2name": "Mon2"}
110 ,{"fusion": "Ralgapb", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 673, "g1end": 674, "
    g1name": "Ralgapb", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 95, "g2end"
    : 96, "g2name": "Ralgapb"}
111 ,{"fusion": "Sf3b1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 676, "g1end": 677, "
    g1name": "Sf3b1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 96, "g2end": 97, "
    g2name": "Sf3b1"}
112 ,{"fusion": "Alkbh5", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 677, "g1end": 678, "
    g1name": "Alkbh5", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 97, "g2end": 98, "
    g2name": "Alkbh5"}
113 ,{"fusion": "Atp9a", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 682, "g1end": 683, "
    g1name": "Atp9a", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 98, "g2end": 99, "
    g2name": "Atp9a"}
114 ,{"fusion": "Fads1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 687, "g1end": 688, "
    g1name": "Fads1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 99, "g2end": 100, "
    g2name": "Fads1"}
115 ,{"fusion": "Tsc2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 692, "g1end": 693, "
    g1name": "Tsc2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 100, "g2end": 101, "
    g2name": "Tsc2"}
116 ,{"fusion": "Usp24", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 695, "g1end": 696, "
    g1name": "Usp24", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 101, "g2end": 102, "
    g2name": "Usp24"}
```

A.3. CONSTRUCCIÓN DE *CIRCOS PLOT*

```
117 ,{"fusion": "Gns", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 703, "g1end": 704, "
    g1name": "Gns", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 102, "g2end": 103, "
    g2name": "Gns"}
118 ,{"fusion": "Kdm5a", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 710, "g1end": 711, "
    g1name": "Kdm5a", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 103, "g2end": 104, "
    g2name": "Kdm5a"}
119 ,{"fusion": "Zfp518a", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 716, "g1end": 717, "
    g1name": "Zfp518a", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 104, "g2end"
    : 105, "g2name": "Zfp518a"}
120 ,{"fusion": "Akap11", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 717, "g1end": 718, "
    g1name": "Akap11", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 105, "g2end"
    : 106, "g2name": "Akap11"}
121 ,{"fusion": "Xrcc5", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 719, "g1end": 720, "
    g1name": "Xrcc5", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 106, "g2end": 107, "
    g2name": "Xrcc5"}
122 ,{"fusion": "Scd2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 720, "g1end": 721, "
    g1name": "Scd2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 107, "g2end": 108, "
    g2name": "Scd2"}
123 ,{"fusion": "Herc2", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 728, "g1end": 729, "
    g1name": "Herc2", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 108, "g2end": 109, "
    g2name": "Herc2"}
124 ,{"fusion": "Sel11", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 729, "g1end": 730, "
    g1name": "Sel11", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 109, "g2end": 110, "
    g2name": "Sel11"}
125 ,{"fusion": "Klh19", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 731, "g1end": 732, "
    g1name": "Klh19", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 110, "g2end": 111, "
    g2name": "Klh19"}
126 ,{"fusion": "Dennd5b", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 733, "g1end": 734, "
    g1name": "Dennd5b", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 111, "g2end"
    : 112, "g2name": "Dennd5b"}
127 ,{"fusion": "Ubr3", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 736, "g1end": 737, "
    g1name": "Ubr3", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 112, "g2end": 113, "
    g2name": "Ubr3"}
128 ,{"fusion": "Ccdc88c", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 737, "g1end": 738, "
    g1name": "Ccdc88c", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 113, "g2end"
    : 114, "g2name": "Ccdc88c"}
129 ,{"fusion": "Glg1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 738, "g1end": 739, "
    g1name": "Glg1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 114, "g2end": 115, "
    g2name": "Glg1"}
130 ,{"fusion": "Herc1", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 739, "g1end": 740, "
    g1name": "Herc1", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 115, "g2end": 116, "
    g2name": "Herc1"}
131 ,{"fusion": "Helz", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 740, "g1end": 741, "
    g1name": "Helz", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 116, "g2end": 117, "
    g2name": "Helz"}
132 ,{"fusion": "Cltc", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 742, "g1end": 743, "
    g1name": "Cltc", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 117, "g2end": 118, "
    g2name": "Cltc"}
133 ,{"fusion": "AI314180", "g1chr": "M1 mutants", "g1start": 745, "g1end"
    : 746, "g1name": "AI314180", "g2chr": "Spermatozoa", "g2start": 118, "
    g2end": 119, "g2name": "AI314180"}
```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
134 ,{"fusion":"Lmtk2","g1chr":"M1 mutants","g1start":746,"g1end":747,"
    g1name":"Lmtk2","g2chr":"Spermatozoa","g2start":119,"g2end":120,
    "g2name":"Lmtk2"}
135 ,{"fusion":"Vps13b","g1chr":"M1 mutants","g1start":749,"g1end":750,"
    g1name":"Vps13b","g2chr":"Spermatozoa","g2start":120,"g2end"
    :121,"g2name":"Vps13b"}
136 ,{"fusion":"4932438A13Rik","g1chr":"M1 mutants","g1start":754,"g1end
    ":755,"g1name":"4932438A13Rik","g2chr":"Spermatozoa","g2start"
    :121,"g2end":122,"g2name":"4932438A13Rik"}
137 ,{"fusion":"Pank3","g1chr":"M1 mutants","g1start":755,"g1end":756,"
    g1name":"Pank3","g2chr":"Spermatozoa","g2start":122,"g2end":123,
    "g2name":"Pank3"}
138 ,{"fusion":"Nf1","g1chr":"M1 mutants","g1start":756,"g1end":757,"
    g1name":"Nf1","g2chr":"Spermatozoa","g2start":123,"g2end":124,"
    g2name":"Nf1"}
139 ,{"fusion":"Pik3c2a","g1chr":"M1 mutants","g1start":758,"g1end":759,
    "g1name":"Pik3c2a","g2chr":"Spermatozoa","g2start":124,"g2end"
    :125,"g2name":"Pik3c2a"}
140 ,{"fusion":"Nr2c2","g1chr":"M1 mutants","g1start":768,"g1end":769,"
    g1name":"Nr2c2","g2chr":"Spermatozoa","g2start":125,"g2end":126,
    "g2name":"Nr2c2"}
141 ,{"fusion":"Lrp5","g1chr":"M1 mutants","g1start":769,"g1end":770,"
    g1name":"Lrp5","g2chr":"Spermatozoa","g2start":126,"g2end":127,"
    g2name":"Lrp5"}
142 ,{"fusion":"Ranbp2","g1chr":"M1 mutants","g1start":775,"g1end":776,"
    g1name":"Ranbp2","g2chr":"Spermatozoa","g2start":127,"g2end"
    :128,"g2name":"Ranbp2"}
143 ,{"fusion":"Hectd1","g1chr":"M1 mutants","g1start":776,"g1end":777,"
    g1name":"Hectd1","g2chr":"Spermatozoa","g2start":128,"g2end"
    :129,"g2name":"Hectd1"}
144 ,{"fusion":"Fads2","g1chr":"M1 mutants","g1start":778,"g1end":779,"
    g1name":"Fads2","g2chr":"Spermatozoa","g2start":129,"g2end":130,
    "g2name":"Fads2"}
145 ,{"fusion":"Usp9x","g1chr":"M1 mutants","g1start":783,"g1end":784,"
    g1name":"Usp9x","g2chr":"Spermatozoa","g2start":130,"g2end":131,
    "g2name":"Usp9x"}
146 ,{"fusion":"Fasn","g1chr":"M1 mutants","g1start":785,"g1end":786,"
    g1name":"Fasn","g2chr":"Spermatozoa","g2start":131,"g2end":132,"
    g2name":"Fasn"}
147 ,{"fusion":"Ddx6","g1chr":"M1 mutants","g1start":786,"g1end":787,"
    g1name":"Ddx6","g2chr":"Spermatozoa","g2start":132,"g2end":133,"
    g2name":"Ddx6"}
148 ,{"fusion":"Ints1","g1chr":"M1 mutants","g1start":791,"g1end":792,"
    g1name":"Ints1","g2chr":"Spermatozoa","g2start":133,"g2end":134,
    "g2name":"Ints1"}
149 ,{"fusion":"Dync1h1","g1chr":"M1 mutants","g1start":792,"g1end":793,
    "g1name":"Dync1h1","g2chr":"Spermatozoa","g2start":134,"g2end"
    :135,"g2name":"Dync1h1"}
150 ]
151 ];
```

A.3.3 Documento html maestro para la contrucción del *plot*

```

1
2 <!DOCTYPE html>
3 <html>
4 <head>
5     <meta charset="utf-8">
6     <title>BioCircos.js</title>
7 </head>
8 <body>
9     <!-- BioCircos.js, JQuery.js and D3.js import -->
10    <script src="../lib/jquery.js"></script>
11    <script src="../lib/d3.js"></script>
12    <script src="../lib/biocircos-1.1.0.js"></script>
13
14        <!-- Prepare a <div> tag with "biocircos" id to set
15            the picture position your will draw in html -->
16    <div id="biocircos"></div>
17 <!-- Data configuration -->
18 <script src="./LINK-sertoli.js"></script>
19 <script src="./LINK-spermatogonia.js"></script>
20 <script src="./LINK-spermatocytes.js"></script>
21 <script src="./LINK-spermatids.js"></script>
22 <script src="./LINK-spermatozoa.js"></script>
23 <!--
24 <script src="./HEAT-sertoli.js"></script>
25 <script src="./HEAT-spermatogonia.js"></script>
26 <script src="./HEAT-spermatocytes.js"></script>
27 <script src="./HEAT-spermatids.js"></script>
28 <script src="./HEAT-spermatozoa.js"></script>
29 <script src="./HEAT-M1.js"></script>
30 -->
31 <script src="./HEAT-all.js"></script>
32 <script src="./targets17.js"></script>
33 <script src="./targets18.js"></script>
34 <script src="./targets19.js"></script>
35 <script src="./targets25.js"></script>
36 <!-- Genome configuration -->
37
38 <script>
39     var BioCircosGenome = [ // human hg19, data tag is
40         BioCircosGenome
41         ["Sertoli" , 55],
42         ["Spermatogonia" , 87],
43         ["Spermatocytes" , 203],
44         ["Spermatids" , 328],
45         ["Spermatozoa" , 135],
46         ["M1 mutants" , 809]
47     ];

```

APÉNDICE A. APÉNDICES

```
47
48 //BioCircos01 = new BioCircos(LINKSertoli, LINKSpermatogonia,
    LINKSpermatocytes, LINKSpermatids, LINKSpermatozoa, BioCircosGenome
    ,{
49 //BioCircos01 = new BioCircos(LINKSpermatozoa, LINKSpermatids,
    LINKSpermatocytes, LINKSpermatogonia, LINKSertoli, HEATMAPSertoli,
    HEATMAPSpermatogonia, HEATMAPSpermatocytes, HEATMAPSpermatids,
    HEATMAPSpermatozoa, HEATMAPM1, HEATMAPall, BioCircosGenome, {
50 //BioCircos01 = new BioCircos(LINKSpermatozoa, LINKSpermatids,
    LINKSpermatocytes, LINKSpermatogonia, LINKSertoli, HEATMAPall,
    targets17, BioCircosGenome, {
51 BioCircos01 = new BioCircos(LINKSpermatozoa, LINKSpermatids,
    LINKSpermatocytes, LINKSpermatogonia, LINKSertoli, HEATMAPall,
    HEATMAP17, HEATMAP18, HEATMAP19, HEATMAP25, BioCircosGenome, {
52   target : "biocircos",
53   svgWidth : 900,
54   svgHeight : 900,
55   innerRadius: 260,
56   outerRadius: 265,
57   genomeFillColor: ["#FFCC00", "#CCFFFF", "#FFCCCC", "#CCCC99",
    #0099CC", "#996699"],
58
59   ticks : {
60     "display" : true,
61     "len" : 5,
62     "color" : "#000",
63     "textSize" : 8,
64     "textcolor" : "#000",
65     "scale" : 10
66   },
67
68   genomeLabel : {
69     "display" : true,
70     "textSize" : 15,
71     "textColor" : "#000",
72     "dx" : 0.05,
73     "dy" : "-1em"
74   },
75 });
76
77
78 BioCircos01.draw_genome(BioCircos01.genomeLength); // BioCircos.js
    callback
79 </script>
80 </body>
81 </html>
```

Bibliografía

- Abdelfattah A.M., Park C. & Choi M.Y. (2014) Update on non-canonical micrornas. *Biomolecular concepts*, **5**:275–287. ISSN 1868-503X.
- Adham I.M., Nayernia K., Burkhardt-Göttges E., O T., Dixkens C., Holstein A.F. & Engel W. (2001) Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (tnp2). *Molecular human reproduction*, **7**:513–520. ISSN 1360-9947.
- Akiyama H., Chaboissier M.C., Behringer R.R., Rowitch D.H., Schedl A., Epstein J.A. & de Crombrughe B. (2004) Essential role of sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**:6502–6507. ISSN 0027-8424.
- Akiyama H., Chaboissier M.C., Martin J.F., Schedl A. & de Crombrughe B. (2002) The transcription factor sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of sox5 and sox6. *Genes & development*, **16**:2813–2828. ISSN 0890-9369.
- Arango N.A., Lovell-Badge R. & Behringer R.R. (1999) Targeted mutagenesis of the endogenous mouse mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*, **99**:409–419. ISSN 0092-8674.
- Armstrong J.F., Pritchard-Jones K., Bickmore W.A., Hastie N.D. & Bard J.B. (1993) The expression of the wilms' tumour gene, wt1, in the developing mammalian embryo. *Mechanisms of development*, **40**:85–97. ISSN 0925-4773.
- Austin S., Ziese M. & Sternberg N. (1981) A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*, **25**:729–736. ISSN 0092-8674.
- Baek D., Villén J., Shin C., Camargo F.D., Gygi S.P. & Bartel D.P. (2008) The impact of micrornas on protein output. *Nature*, **455**:64–71. ISSN 1476-4687.
- Barrionuevo F., Bagheri-Fam S., Klattig J., Kist R., Taketo M.M., Englert C. & Scherer G. (2006) Homozygous inactivation of sox9 causes complete xy sex reversal in mice. *Biology of reproduction*, **74**:195–201. ISSN 0006-3363.
- Barrionuevo F., Georg I., Scherthan H., Lécureuil C., Guillou F., Wegner M. & Scherer G. (2009) Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of sox9 but fails in the combined absence of sox9 and sox8. *Developmental biology*, **327**:301–312. ISSN 1095-564X.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrionuevo F., Naumann A., Bagheri-Fam S., Speth V., Taketo M.M., Scherer G. & Neubüser A. (2008) Sox9 is required for invagination of the otic placode in mice. *Developmental biology*, **317**:213–224. ISSN 1095-564X.
- Barrionuevo F. & Scherer G. (2010) Sox e genes: Sox9 and sox8 in mammalian testis development. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **42**:433–436. ISSN 1878-5875.
- Barrionuevo F.J., Hurtado A., Kim G.J., Real F.M., Bakkali M., Kopp J.L., Sander M., Scherer G., Burgos M. & Jiménez R. (2016) Sox9 and sox8 protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *eLife*, **5**. ISSN 2050-084X.
- Barrios F., Filipponi D., Pellegrini M., Paronetto M.P., Di Siena S., Geremia R., Rossi P., De Felici M., Jannini E.A. & Dolci S. (2010) Opposing effects of retinoic acid and fgf9 on nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. *Journal of cell science*, **123**:871–880. ISSN 1477-9137.
- Bastide P., Darido C., Pannequin J., Kist R., Robine S., Marty-Double C., Bibeau F., Scherer G., Joubert D., Hollande F., Blache P. & Jay P. (2007) Sox9 regulates cell proliferation and is required for paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *The Journal of cell biology*, **178**:635–648. ISSN 0021-9525.
- Bell D.M., Leung K.K., Wheatley S.C., Ng L.J., Zhou S., Ling K.W., Sham M.H., Koopman P., Tam P.P. & Cheah K.S. (1997) Sox9 directly regulates the type-ii collagen gene. *Nature genetics*, **16**:174–178. ISSN 1061-4036.
- Berezikov E., Chung W.J., Willis J., Cuppen E. & Lai E.C. (2007) Mammalian mirtron genes. *Molecular cell*, **28**:328–336. ISSN 1097-2765.
- Berta P., Hawkins J.R., Sinclair A.H., Taylor A., Griffiths B.L., Goodfellow P.N. & Fellous M. (1990) Genetic evidence equating sry and the testis-determining factor. *Nature*, **348**:448–450. ISSN 0028-0836.
- Bian S., Hong J., Li Q., Schebelle L., Pollock A., Knauss J.L., Garg V. & Sun T. (2013) MicroRNA cluster mir-17-92 regulates neural stem cell expansion and transition to intermediate progenitors in the developing mouse neocortex. *Cell reports*, **3**:1398–1406. ISSN 2211-1247.
- Biason-Lauber A. (2010) Control of sex development. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, **24**:163–186. ISSN 1878-1594.
- Birk O.S., Casiano D.E., Wassif C.A., Cogliati T., Zhao L., Zhao Y., Grinberg A., Huang S., Kreidberg J.A., Parker K.L., Porter F.D. & Westphal H. (2000) The lim homeobox gene *lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature*, **403**:909–913. ISSN 0028-0836.
- Bishop C.E., Whitworth D.J., Qin Y., Agoulnik A.I., Agoulnik I.U., Harrison W.R., Behringer R.R. & Overbeek P.A. (2000) A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant xx sex reversal in the mouse. *Nature genetics*, **26**:490–494. ISSN 1061-4036.
- Björk J.K., Sandqvist A., Elsing A.N., Kotaja N. & Sistonen L. (2010) mir-18, a member of oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. *Development (Cambridge)*

- England*), **137**:3177–3184. ISSN 1477-9129.
- Bohnsack M.T., Czaplinski K. & Gorchich D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, **10**:185–191. ISSN 1355-8382.
- Bowles J., Schepers G. & Koopman P. (2000) Phylogeny of the sox family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental biology*, **227**:239–255. ISSN 0012-1606.
- Bradford S.T., Hiramatsu R., Maddugoda M.P., Bernard P., Chaboissier M.C., Sinclair A., Schedl A., Harley V., Kanai Y., Koopman P. & Wilhelm D. (2009a) The cerebellin 4 precursor gene is a direct target of *sry* and *sox9* in mice. *Biology of reproduction*, **80**:1178–1188. ISSN 0006-3363.
- Bradford S.T., Wilhelm D., Bandiera R., Vidal V., Schedl A. & Koopman P. (2009b) A cell-autonomous role for *wt1* in regulating *sry* in vivo. *Human molecular genetics*, **18**:3429–3438. ISSN 1460-2083.
- Brennan J. & Capel B. (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature reviews. Genetics*, **5**:509–521. ISSN 1471-0056.
- Brett J.O., Renault V.M., Rafalski V.A., Webb A.E. & Brunet A. (2011) The microRNA cluster *mir-106b-25* regulates adult neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Ageing*, **3**:108–124. ISSN 1945-4589.
- Britsch S., Goerich D.E., Riethmacher D., Peirano R.I., Rossner M., Nave K.A., Birchmeier C. & Wegner M. (2001) The transcription factor *sox10* is a key regulator of peripheral glial development. *Genes & development*, **15**:66–78. ISSN 0890-9369.
- Brocard J., Feil R., Chambon P. & Metzger D. (1998) A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic acids research*, **26**:4086–4090. ISSN 0305-1048.
- Buchold G.M., Coarfa C., Kim J., Milosavljevic A., Gunaratne P.H. & Matzuk M.M. (2010) Analysis of microRNA expression in the prepubertal testis. *PLoS one*, **5**:e15317. ISSN 1932-6203.
- Bullejos M., Bowles J. & Koopman P. (2002) Extensive vascularization of developing mouse ovaries revealed by caveolin-1 expression. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **225**:95–99. ISSN 1058-8388.
- Bullejos M. & Koopman P. (2001) Spatially dynamic expression of *sry* in mouse genital ridges. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **221**:201–205. ISSN 1058-8388.
- Bullejos M. & Koopman P. (2004) Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Molecular reproduction and development*, **68**:422–428. ISSN 1040-452X.
- Burn S.F. (2012) Detection of β -galactosidase activity: X-gal staining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **886**:241–250. ISSN 1940-6029.

BIBLIOGRAFÍA

- Burris T.P., Guo W., Le T. & McCabe E.R. (1995) Identification of a putative steroidogenic factor-1 response element in the dax-1 promoter. *Biochemical and biophysical research communications*, **214**:576–581. ISSN 0006-291X.
- Bushati N. & Cohen S.M. (2007) microRNA functions. *Annual review of cell and developmental biology*, **23**:175–205. ISSN 1081-0706.
- Byskov A.G. (1986) Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological reviews*, **66**:71–117. ISSN 0031-9333.
- Cadigan K. & Nusse R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, **11**:3286–305.
- Carthew R.W. & Sontheimer E.J. (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, **136**:642–655. ISSN 1097-4172.
- Chaboissier M.C., Kobayashi A., Vidal V.I.P., Lützkendorf S., van de Kant H.J.G., Wegner M., de Rooij D.G., Behringer R.R. & Schedl A. (2004) Functional analysis of sox8 and sox9 during sex determination in the mouse. *Development (Cambridge, England)*, **131**:1891–1901. ISSN 0950-1991.
- Chakraborty P. & Roy S.K. (2015) Bone morphogenetic protein 2 promotes primordial follicle formation in the ovary. *Scientific reports*, **5**:12664. ISSN 2045-2322.
- Chan S.P. & Slack F.J. (2007) And now introducing mammalian mirtrons. *Developmental cell*, **13**:605–607. ISSN 1534-5807.
- Chang H., Gao F., Guillou F., Take-to M.M., Huff V. & Behringer R.R. (2008) Wt1 negatively regulates beta-catenin signaling during testis development. *Development (Cambridge, England)*, **135**:1875–1885. ISSN 0950-1991.
- Chang T.C. & Mendell J.T. (2007) microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*, **8**:215–239. ISSN 1527-8204.
- Chang Y.F., Lee-Chang J.S., Imam J.S., Buddavarapu K.C., Subaran S.S., Sinha-Hikim A.P., Gorospe M. & Rao M.K. (2012) Interaction between microRNAs and actin-associated protein arpc5 regulates translational suppression during male germ cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**:5750–5755. ISSN 1091-6490.
- Chapman D.L. & Wolgemuth D.J. (1994) Expression of proliferating cell nuclear antigen in the mouse germ line and surrounding somatic cells suggests both proliferation-dependent and -independent modes of function. *The International journal of developmental biology*, **38**:491–497. ISSN 0214-6282.
- Chassot A.A., Ranc F., Gregoire E.P., Roepers-Gajadien H.L., Taketo M.M., Camerino G., de Rooij D.G., Schedl A. & Chaboissier M.C. (2008) Activation of beta-catenin signaling by rspl1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Human molecular genetics*, **17**:1264–1277. ISSN 1460-2083.
- Chen S.R., Tang J.X., Cheng J.M., Li J., Jin C., Li X.Y., Deng S.L., Zhang Y.,

- Wang X.X. & Liu Y.X. (2015) Loss of *gata4* in sertoli cells impairs the spermatogonial stem cell niche and causes germ cell exhaustion by attenuating chemokine signaling. *Oncotarget*, **6**:37012–37027. ISSN 1949-2553.
- Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K. & Shiekhattar R. (2005) *Trbp* recruits the dicer complex to *ago2* for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, **436**:740–744. ISSN 1476-4687.
- Cheng C.Y. & Mruk D.D. (2002) Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological reviews*, **82**:825–874. ISSN 0031-9333.
- Cheung M. & Briscoe J. (2003) Neural crest development is regulated by the transcription factor *sox9*. *Development (Cambridge, England)*, **130**:5681–5693. ISSN 0950-1991.
- Cheung M., Chaboissier M.C., Mynett A., Hirst E., Schedl A. & Briscoe J. (2005) The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Developmental cell*, **8**:179–192. ISSN 1534-5807.
- Choi Y. & Rajkovic A. (2006) Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **63**:579–590. ISSN 1420-682X.
- Chun S.Y., McGee E.A., Hsu S.Y., Minami S., LaPolt P.S., Yao H.H., Bahr J.M., Gougeon A., Schomberg D.W. & Hsueh A.J. (1999) Restricted expression of *wt1* messenger ribonucleic acid in immature ovarian follicles: uniformity in mammalian and avian species and maintenance during reproductive senescence. *Biology of reproduction*, **60**:365–373. ISSN 0006-3363.
- Connor F., Wright E., Denny P., Koopman P. & Ashworth A. (1995) The sry-related hmg box-containing gene *sox6* is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic acids research*, **23**:3365–3372. ISSN 0305-1048.
- Cool J., DeFalco T. & Capel B. (2012) Testis formation in the fetal mouse: dynamic and complex de novo tubulogenesis. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, **1**:847–859. ISSN 1759-7692.
- Crisponi L., Deiana M., Loi A., Chiappe F., Uda M., Amati P., Bisceglia L., Zelante L., Nagaraja R., Porcu S., Ristaldi M.S., Marzella R., Rocchi M., Nicolino M., Lienhardt-Roussie A., Nivelon A., Verloes A., Schlessinger D., Gasparini P., Bonneau D., Cao A. & Pilia G. (2001) The putative forkhead transcription factor *foxl2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature genetics*, **27**:159–166. ISSN 1061-4036.
- Cui Y., Chen X., Luo H., Fan Z., Luo J., He S., Yue H., Zhang P. & Chen R. (2016) Biocircos.js: an interactive circos javascript library for biological data visualization on web applications. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **32**:1740–1742. ISSN 1367-4811.
- Dadhich R.K., Barrionuevo F.J., Lupiáñez D.G., Real F.M., Burgos M. & Jiménez R. (2011) Expression of genes controlling testicular development in adult testis of the seasonally breeding iberian mole. *Sexual development : genetics*,

BIBLIOGRAFÍA

- molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, **5**:77–88. ISSN 1661-5433.
- Dadhich R.K., Barrionuevo F.J., Real F.M., Lupiañez D.G., Ortega E., Burgos M. & Jiménez R. (2013) Identification of live germ-cell desquamation as a major mechanism of seasonal testis regression in mammals: a study in the iberian mole (*talpa occidentalis*). *Biology of reproduction*, **88**:101. ISSN 1529-7268.
- Dai L., Tsai-Morris C.H., Sato H., Villar J., Kang J.H., Zhang J. & Dufau M.L. (2011) Testis-specific mirna-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular rna helicase (*grth/ddx25*)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: implications of its role in germ cell development. *The Journal of biological chemistry*, **286**:44306–44318. ISSN 1083-351X.
- Dale T. (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J*, **329** (Pt 2):209–23.
- Davis B.N. & Hata A. (2009) Regulation of microRNA biogenesis: A myriad of mechanisms. *Cell communication and signaling : CCS*, **7**:18. ISSN 1478-811X.
- De Santa Barbara P., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Sudbeck P., Scherer G., Poulat F. & Berta P. (1998) Direct interaction of sry-related protein sox9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-müllerian hormone gene. *Molecular and cellular biology*, **18**:6653–6665. ISSN 0270-7306.
- Denli A.M., Tops B.B.J., Plasterk R.H.A., Ketting R.F. & Hannon G.J. (2004) Processing of primary micrnas by the microprocessor complex. *Nature*, **432**:231–235. ISSN 1476-4687.
- Dennis G., Sherman B.T., Hosack D.A., Yang J., Gao W., Lane H.C. & Lempicki R.A. (2003) David: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome biology*, **4**:P3. ISSN 1474-760X.
- Denny P., Swift S., Brand N., Dabhade N., Barton P. & Ashworth A. (1992) A conserved family of genes related to the testis determining gene, sry. *Nucleic acids research*, **20**:2887. ISSN 0305-1048.
- Diederichs S. & Haber D.A. (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, **131**:1097–1108. ISSN 0092-8674.
- Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M. & Gingeras T.R. (2013) Star: ultrafast universal rna-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **29**:15–21. ISSN 1367-4811.
- Dym M. (1973) The fine structure of the monkey (*macaca*) sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *The Anatomical record*, **175**:639–656. ISSN 0003-276X.
- Dym M. & Fawcett D.W. (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of reproduction*, **3**:308–326. ISSN 0006-3363.
- Eggers S., Ohnesorg T. & Sinclair A. (2014) Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nature re-*

- views. Endocrinology*, **10**:673–683. ISSN 1759-5037.
- El Meliegy A., Motawi A. & El Salam M.A.A. (2018) Systematic review of hormone replacement therapy in the infertile man. *Arab Journal of Urology*, **16**:140–147. ISSN 2090-598X.
- Elzaiat M., Jouneau L., Thépot D., Klopp C., Allais-Bonnet A., Cabau C., André M., Chaffaux S., Crihiu E.P., Pailhoux E. & Pannetier M. (2014) High-throughput sequencing analyses of xx genital ridges lacking foxl2 reveal dmrt1 up-regulation before sox9 expression during the sex-reversal process in goats. *Biology of reproduction*, **91**:153. ISSN 1529-7268.
- Enomoto A., Kido N., Ito M., Morita A., Matsumoto Y., Takamatsu N., Hosoi Y. & Miyagawa K. (2008) Negative regulation of MEKK1/2 signaling by serine-threonine kinase 38 (STK38). *Oncogene*, **27**:1930–1938. ISSN 1476-5594.
- Feil R., Brocard J., Mascrez B., LeMeur M., Metzger D. & Chambon P. (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**:10887–10890. ISSN 0027-8424.
- Flynt A.S. & Lai E.C. (2008) Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nature reviews. Genetics*, **9**:831–842. ISSN 1471-0064.
- Foster J.W., Dominguez-Steglich M.A., Guioli S., Kwok C., Weller P.A., Stevanović M., Weissenbach J., Mansour S., Young I.D. & Goodfellow P.N. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an sry-related gene. *Nature*, **372**:525–530. ISSN 0028-0836.
- Fraietta R., Zylberstejn D.S. & Esteves S.C. (2013) Hypogonadotropic Hypogonadism Revisited. *Clinics (Sao Paulo)*, **68**:81–88. ISSN 1807-5932.
- Friedman R.C., Farh K.K.H., Burge C.B. & Bartel D.P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, **19**:92–105. ISSN 1088-9051.
- Fröjdman K., Harley V.R. & Pelliniemi L.J. (2000) Sox9 protein in rat sertoli cells is age and stage dependent. *Histochemistry and cell biology*, **113**:31–36. ISSN 0948-6143.
- Fujimoto Y., Tanaka S.S., Yamaguchi Y.L., Kobayashi H., Kuroki S., Tachibana M., Shinomura M., Kanai Y., Morohashi K.I., Kawakami K. & Nishinakamura R. (2013) Homeoproteins six1 and six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Developmental cell*, **26**:416–430. ISSN 1878-1551.
- Furuyama K., Kawaguchi Y., Akiyama H., Horiguchi M., Kodama S., Kuhara T., Hosokawa S., Elbahrawy A., Soeda T., Koizumi M., Masui T., Kawaguchi M., Takaori K., Doi R., Nishi E., Kakinoiki R., Deng J.M., Behringer R.R., Nakamura T. & Uemoto S. (2011) Continuous cell supply from a sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature genetics*, **43**:34–41. ISSN 1546-1718.
- Gallardo T., Shirley L., John G.B. & Castillon D.H. (2007) Generation of a germ cell-specific mouse transgenic cre line,

BIBLIOGRAFÍA

- vasa-cre. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, **45**:413–417. ISSN 1526-954X.
- Gao F., Maiti S., Alam N., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., Lécureuil C., Guillou F. & Huff V. (2006) The wilms tumor gene, wt1, is required for sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**:11987–11992. ISSN 0027-8424.
- Garzon R., Calin G.A. & Croce C.M. (2009) MicroRNAs in cancer. *Annual review of medicine*, **60**:167–179. ISSN 1545-326X.
- Georg I., Barrionuevo F., Wiech T. & Scherer G. (2012) Sox9 and sox8 are required for basal lamina integrity of testis cords and for suppression of foxl2 during embryonic testis development in mice. *Biology of reproduction*, **87**:99. ISSN 1529-7268.
- Gow A., Southwood C.M., Li J.S., Pariali M., Riordan G.P., Brodie S.E., Danias J., Bronstein J.M., Kachar B. & Lazzarini R.A. (1999) Cns myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in osp/claudin-11 null mice. *Cell*, **99**:649–659. ISSN 0092-8674.
- Greenlee A.R., Shiao M.S., Snyder E., Buaas F.W., Gu T., Stearns T.M., Sharma M., Murchison E.P., Puente G.C. & Braun R.E. (2012) Deregulated sex chromosome gene expression with male germ cell-specific loss of dicer1. *PLoS one*, **7**:e46359. ISSN 1932-6203.
- Gregory R.I., Yan K.P., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N. & Shiekhattar R. (2004) The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, **432**:235–240. ISSN 1476-4687.
- Griswold M.D. (1998) The central role of sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, **9**:411–416. ISSN 1084-9521.
- Grossman H. & Shalgi R. (2016) A role of microRNAs in cell differentiation during gonad development. *Results and problems in cell differentiation*, **58**:309–336. ISSN 0080-1844.
- Gu H., Zou Y.R. & Rajewsky K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through cre-loxp-mediated gene targeting. *Cell*, **73**:1155–1164. ISSN 0092-8674.
- Guarnieri A.L., Towers C.G., Drasin D.J., Oliphant M.U.J., Andrysik Z., Hotz T.J., Vartuli R.L., Linklater E.S., Pandey A., Khanal S., Espinosa J.M. & Ford H.L. (2018) The mir-106b-25 cluster mediates breast tumor initiation through activation of notch1 via direct repression of nedd4l. *Oncogene*. ISSN 1476-5594.
- Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Münsterberg A., Vivian N., Goodfellow P. & Lovell-Badge R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, **346**:245–250. ISSN 0028-0836.
- Gunes S., Al-Sadaan M. & Agarwal A. (2015) Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, **31**:309–319. ISSN 1472-6483, 1472-6491.

- Guo W., Keckesova Z., Donaher J.L., Shibusue T., Tischler V., Reinhardt F., Itzkovitz S., Noske A., Zürrer-Härdi U., Bell G., Tam W.L., Mani S.A., van Oudenaarden A. & Weinberg R.A. (2012) Slug and sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell*, **148**:1015–1028. ISSN 1097-4172.
- Gupta S., Read D.E., Deepti A., Cawley K., Gupta A., Oommen D., Verfaillie T., Matus S., Smith M.A., Mott J.L., Agostinis P., Hetz C. & Samali A. (2012) Perk-dependent repression of miR-106b-25 cluster is required for ER stress-induced apoptosis. *Cell Death & Disease*, **3**:e333. ISSN 2041-4889.
- Haase A.D., Jaskiewicz L., Zhang H., Lainé S., Sack R., Gatignol A. & Filipowicz W. (2005) Trbp, a regulator of cellular pkr and hiv-1 virus expression, interacts with dicer and functions in rna silencing. *EMBO reports*, **6**:961–967. ISSN 1469-221X.
- Hacker A., Capel B., Goodfellow P. & Lovell-Badge R. (1995) Expression of sry, the mouse sex determining gene. *Development (Cambridge, England)*, **121**:1603–1614. ISSN 0950-1991.
- Haldar S., Roy A. & Banerjee S. (2014) Differential regulation of MCM7 and its intronic miRNA cluster miR-106b-25 during megakaryopoiesis induced polyploidy. *RNA Biology*, **11**:1137–1147. ISSN 1547-6286.
- Hammes A., Guo J.K., Lutsch G., Lehesste J.R., Landrock D., Ziegler U., Gubler M.C. & Schedl A. (2001) Two splice variants of the wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*, **106**:319–329. ISSN 0092-8674.
- Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R. & Hannon G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of rna. *Science (New York, N.Y.)*, **293**:1146–1150. ISSN 0036-8075.
- Han J., Lee Y., Yeom K.H., Kim Y.K., Jin H. & Kim V.N. (2004) The drosha-dgcr8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*, **18**:3016–3027. ISSN 0890-9369.
- Han Y.C., Vidigal J.A., Mu P., Yao E., Singh I., González A.J., Concepcion C.P., Bonetti C., Ogradowski P., Carver B., Selleri L., Betel D., Leslie C. & Ventura A. (2015) An allelic series of mir-17-92-mutant mice uncovers functional specialization and cooperation among members of a microRNA polycistron. *Nature genetics*, **47**:766–775. ISSN 1546-1718.
- Hanley N.A., Hagan D.M., Clement-Jones M., Ball S.G., Strachan T., Salas-Cortés L., McElreavey K., Lindsay S., Robson S., Bullen P., Ostrer H. & Wilson D.I. (2000) Sry, sox9, and dax1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of development*, **91**:403–407. ISSN 0925-4773.
- Harley V.R. & Goodfellow P.N. (1994) The biochemical role of sry in sex determination. *Molecular reproduction and development*, **39**:184–193. ISSN 1040-452X.
- Harley V.R., Jackson D.I., Hextall P.J., Hawkins J.R., Berkovitz G.D., Sockanathan S., Lovell-Badge R. & Goodfellow P.N. (1992) Dna binding activity of recombinant sry from normal males and xy females. *Science (New York, N.Y.)*, **255**:453–456. ISSN 0036-8075.

BIBLIOGRAFÍA

- Hayashi K., Chuva de Sousa Lopes S.M., Kaneda M., Tang F., Hajkova P., Lao K., O'Carroll D., Das P.P., Tarakhovsky A., Miska E.A. & Surani M.A. (2008) MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS one*, **3**:e1738. ISSN 1932-6203.
- Hayashita Y., Osada H., Tatematsu Y., Yamada H., Yanagisawa K., Tomida S., Yatabe Y., Kawahara K., Sekido Y. & Takahashi T. (2005) A polycistronic microRNA cluster, mir-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research*, **65**:9628–9632. ISSN 0008-5472.
- He L., Thomson J.M., Hemann M.T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe S.W., Hannon G.J. & Hammond S.M. (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, **435**:828–833. ISSN 1476-4687.
- He X., Bougioukli S., Ortega B., Arevalo E., Lieberman J.R. & McMahon A.P. (2017) Sox9 positive periosteal cells in fracture repair of the adult mammalian long bone. *Bone*, **103**:12–19. ISSN 1873-2763.
- He Z., Jiang J., Kokkinaki M., Tang L., Zeng W., Gallicano I., Dobrinski I. & Dym M. (2013) Mirna-20 and mirna-106a regulate spermatogonial stem cell renewal at the post-transcriptional level via targeting stat3 and ccnd1. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **31**:2205–2217. ISSN 1549-4918.
- Hess R.A. & Renato de Franca L. (2008) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in experimental medicine and biology*, **636**:1–15. ISSN 0065-2598.
- Ho J., Pandey P., Schatton T., Sims-Lucas S., Khalid M., Frank M.H., Hartwig S. & Kreidberg J.A. (2011) The proapoptotic protein bim is a microRNA target in kidney progenitors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, **22**:1053–1063. ISSN 1533-3450.
- Hochman L., Segev N., Sternberg N. & Cohen G. (1983) Site-specific recombinational circularization of bacteriophage p1 dna. *Virology*, **131**:11–17. ISSN 0042-6822.
- Hoess R.H. & Abremski K. (1985) Mechanism of strand cleavage and exchange in the cre-lox site-specific recombination system. *Journal of molecular biology*, **181**:351–362. ISSN 0022-2836.
- Holdcraft R.W. & Braun R.E. (2004) Androgen receptor function is required in sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development (Cambridge, England)*, **131**:459–467. ISSN 0950-1991.
- Hosking B.M., Muscat G.E., Koopman P.A., Dowhan D.H. & Dunn T.L. (1995) Trans-activation and dna-binding properties of the transcription factor, sox-18. *Nucleic acids research*, **23**:2626–2628. ISSN 0305-1048.
- Hossain A. & Saunders G.F. (2001) The human sex-determining gene sry is a direct target of wt1. *The Journal of biological chemistry*, **276**:16817–16823. ISSN 0021-9258.
- Houston C.S., Opitz J.M., Spranger J.W., Macpherson R.I., Reed M.H., Gilbert E.F., Herrmann J. & Schinzel A. (1983) The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported

- by maroteaux et al in 1971. *American journal of medical genetics*, **15**:3–28. ISSN 0148-7299.
- Hu Y.C., Okumura L.M. & Page D.C. (2013) Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS genetics*, **9**:e1003629. ISSN 1553-7404.
- Huang B., Wang S., Ning Y., Lamb A.N. & Bartley J. (1999) Autosomal xx sex reversal caused by duplication of sox9. *American journal of medical genetics*, **87**:349–353. ISSN 0148-7299.
- Hurtado A., Real F.M., Palomino R., Carmona F.D., Burgos M., Jiménez R. & Barrionuevo F.J. (2018) Sertoli cell-specific ablation of mir-17-92 cluster significantly alters whole testis transcriptome without apparent phenotypic effects. *PloS one*, **13**:e0197685. ISSN 1932-6203.
- Huszar J.M. & Payne C.J. (2013) MicroRNA 146 (mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice. *Biology of reproduction*, **88**:15. ISSN 1529-7268.
- Hutvagner G. & Zamore P.D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science (New York, N. Y.)*, **297**:2056–2060. ISSN 1095-9203.
- Ivanovska I., Ball A.S., Diaz R.L., Magnus J.F., Kibukawa M., Schelter J.M., Kobayashi S.V., Lim L., Burchard J., Jackson A.L., Linsley P.S. & Cleary M.A. (2008) MicroRNAs in the miR-106b Family Regulate p21/CDKN1a and Promote Cell Cycle Progression. *Mol. Cell. Biol.*, **28**:2167–2174. ISSN 0270-7306, 1098-5549.
- Jeanes A., Wilhelm D., Wilson M.J., Bowles J., McClive P.J., Sinclair A.H. & Koopman P. (2005) Evaluation of candidate markers for the peritubular myoid cell lineage in the developing mouse testis. *Reproduction (Cambridge, England)*, **130**:509–516. ISSN 1470-1626.
- Jeong D.G., Yoon T.S., Kim J.H., Shim M.Y., Jung S.K., Son J.H., Ryu S.E. & Kim S.J. (2006) Crystal structure of the catalytic domain of human MAP kinase phosphatase 5: structural insight into constitutively active phosphatase. *J. Mol. Biol.*, **360**:946–955. ISSN 0022-2836.
- Jeske Y.W., Bowles J., Greenfield A. & Koopman P. (1995) Expression of a linear sry transcript in the mouse genital ridge. *Nature genetics*, **10**:480–482. ISSN 1061-4036.
- Jiménez R. (2009) Ovarian organogenesis in mammals: mice cannot tell us everything. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, **3**:291–301. ISSN 1661-5433.
- Jorgensen J.S. & Gao L. (2005) Irx3 is differentially up-regulated in female gonads during sex determination. *Gene expression patterns : GEP*, **5**:756–762. ISSN 1567-133X.
- Jäger R.J., Anvret M., Hall K. & Scherer G. (1990) A human xy female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene sry. *Nature*, **348**:452–454. ISSN 0028-0836.
- Kan T., Sato F., Ito T., Matsumura N., David S., Cheng Y., Agarwal R., Paun B.C., Jin Z., Olaru A.V., Selaru F.M., Hamilton J.P., Yang J., Abraham J.M., Mori Y. & Meltzer S.J. (2009) The

BIBLIOGRAFÍA

- mir-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and bim. *Gastroenterology*, **136**:1689–1700. ISSN 1528-0012.
- Kanatsu-Shinohara M., Takehashi M., Takashima S., Lee J., Morimoto H., Chuma S., Raducanu A., Nakatsuji N., Fässler R. & Shinohara T. (2008) Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. *Cell stem cell*, **3**:533–542. ISSN 1875-9777.
- Katoh Y., Takemori H., Min L., Murakami M., Doi J., Horike N. & Okamoto M. (2004) Salt-inducible kinase-1 represses cAMP response element-binding protein activity both in the nucleus and in the cytoplasm: Cytoplasmic SIK1 represses CREB. *European Journal of Biochemistry*, **271**:4307–4319. ISSN 00142956, 14321033.
- Katoh-Fukui Y., Miyabayashi K., Komatsu T., Owaki A., Baba T., Shima Y., Kidokoro T., Kanai Y., Schedl A., Wilhelm D., Koopman P., Okuno Y. & Morohashi K.i. (2012) Cbx2, a polycomb group gene, is required for sry gene expression in mice. *Endocrinology*, **153**:913–924. ISSN 1945-7170.
- Katoh-Fukui Y., Tsuchiya R., Shiroishi T., Nakahara Y., Hashimoto N., Noguchi K. & Higashinakagawa T. (1998) Male-to-female sex reversal in m33 mutant mice. *Nature*, **393**:688–692. ISSN 0028-0836.
- Kaur G., Mital P. & Dufour J.M. (2013) Testisimmune privilege - assumptions , javax.xml.bind.jaxbelement@670a5101, facts. *Animal reproduction*, **10**:3–15. ISSN 1806-9614.
- Kaur G., Thompson L.A. & Dufour J.M. (2014) Sertoli cells—immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, **30**:36–44. ISSN 1096-3634.
- Kawakami K., Sato S., Ozaki H. & Ikeda K. (2000) Six family genes—structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bio-Essays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **22**:616–626. ISSN 0265-9247.
- Kent J., Wheatley S.C., Andrews J.E., Sinclair A.H. & Koopman P. (1996) A male-specific role for sox9 in vertebrate sex determination. *Development (Cambridge, England)*, **122**:2813–2822. ISSN 0950-1991.
- Khoo C., Utheim T.P. & Sehic A. (2016) The three paralogous microRNA clusters in development and disease, mir-17-92, mir-106a-363, and mir-106b-25. *Scientifica*, **2016**:1379643. ISSN 2090-908X.
- Khvorova A., Reynolds A. & Jayasena S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**:209–216. ISSN 0092-8674.
- Kim G.J., Georg I., Scherthan H., Merkschlager M., Guillou F., Scherer G. & Barrionuevo F. (2010) Dicer is required for sertoli cell function and survival. *The International journal of developmental biology*, **54**:867–875. ISSN 1696-3547.
- Kim S., Hwang D.W. & Lee D.S. (2009a) A study of microRNAs in silico and in vivo: bioimaging of microRNA biogenesis and regulation. *The FEBS journal*, **276**:2165–2174. ISSN 1742-4658.

- Kim V.N., Han J. & Siomi M.C. (2009b) Biogenesis of small rnas in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **10**:126–139. ISSN 1471-0080.
- Kim Y., Kobayashi A., Sekido R., DiNapoli L., Brennan J., Chaboissier M.C., Poulat F., Behringer R.R., Lovell-Badge R. & Capel B. (2006) Fgf9 and wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS biology*, **4**:e187. ISSN 1545-7885.
- Kist R., Schrewe H., Balling R. & Scherer G. (2002) Conditional inactivation of sox9: a mouse model for campomelic dysplasia. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, **32**:121–123. ISSN 1526-954X.
- Kluin P.M., Kramer M.F. & de Rooij D.G. (1984) Proliferation of spermatogonia and sertoli cells in maturing mice. *Anatomy and embryology*, **169**:73–78. ISSN 0340-2061.
- Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P. & Lovell-Badge R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for sry. *Nature*, **351**:117–121. ISSN 0028-0836.
- Koopman P., Münsterberg A., Capel B., Vivian N. & Lovell-Badge R. (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, **348**:450–452. ISSN 0028-0836.
- Kopera I.A., Bilinska B., Cheng C.Y. & Mruk D.D. (2010) Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **365**:1593–1605. ISSN 1471-2970.
- Kopp J.L., Dubois C.L., Schaffer A.E., Hao E., Shih H.P., Seymour P.A., Ma J. & Sander M. (2011) Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development (Cambridge, England)*, **138**:653–665. ISSN 1477-9129.
- Korhonen H.M., Meikar O., Yadav R.P., Papaioannou M.D., Romero Y., Da Ros M., Herrera P.L., Toppari J., Nef S. & Kotaja N. (2011) Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice. *PloS one*, **6**:e24821. ISSN 1932-6203.
- Kotaja N. (2014) Micrnas and spermatogenesis. *Fertility and sterility*, **101**:1552–1562. ISSN 1556-5653.
- Kozomara A. & Griffiths-Jones S. (2011) mirbase: integrating microrna annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*, **39**:D152–D157. ISSN 1362-4962.
- Kreidberg J.A., Sariola H., Loring J.M., Maeda M., Pelletier J., Housman D. & Jaenisch R. (1993) Wt-1 is required for early kidney development. *Cell*, **74**:679–691. ISSN 0092-8674.
- Kühn R., Schwenk F., Aguet M. & Rajewsky K. (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science (New York, N.Y.)*, **269**:1427–1429. ISSN 0036-8075.
- Lee J.H., Choi S.K., Roll-Mecak A., Burley S.K. & Dever T.E. (1999) Universal conservation in translation initiation revealed by human and archaeal homologs of bacterial translation initiation factor IF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**:4342–4347. ISSN 0027-8424.
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rådmark

BIBLIOGRAFÍA

- O., Kim S. & Kim V.N. (2003) The nuclear rnaase iii drosha initiates microrna processing. *Nature*, **425**:415–419. ISSN 1476-4687.
- Lee Y., Hur I., Park S.Y., Kim Y.K., Suh M.R. & Kim V.N. (2006) The role of pact in the rna silencing pathway. *The EMBO journal*, **25**:522–532. ISSN 0261-4189.
- Lefebvre V., Dumitriu B., Penzo-Méndez A., Han Y. & Pallavi B. (2007) Control of cell fate and differentiation by sry-related high-mobility-group box (sox) transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **39**:2195–2214. ISSN 1357-2725.
- Lefèvre C., Jobard F., Caux F., Bouadjar B., Karaduman A., Heilig R., Lakhdar H., Wollenberg A., Verret J.L., Weissenbach J., Özgüç M., Lathrop M., Prud'homme J.F. & Fischer J. (2001) Mutations in CGI-58, the Gene Encoding a New Protein of the Esterase/Lipase/Thioesterase Subfamily, in Chanarin-Dorfman Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, **69**:1002–1012. ISSN 00029297.
- Lentjes M.H., Niessen H.E., Akiyama Y., Bruine A.P.d., Melotte V. & Engeland M.v. (2016) The emerging role of GATA transcription factors in development and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, **18**. ISSN 1462-3994.
- Li F., Guo Y., Liu J. & Zhang R. (2017a) The significance of elevated plasma expression of microrna 106b 25 clusters in gastric cancer. *PLoS one*, **12**:e0178427. ISSN 1932-6203.
- Li Y., Tan W., Neo T.W.L., Aung M.O., Wasser S., Lim S.G. & Tan T.M.C. (2009) Role of the mir-106b-25 microrna cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer science*, **100**:1234–1242. ISSN 1349-7006.
- Li Y., Zhang L., Hu Y., Chen M., Han F., Qin Y., Chen M., Cui X., Duo S., Tang F. & Gao F. (2017b) β -catenin directs the transformation of testis sertoli cells to ovarian granulosa-like cells by inducing foxl2 expression. *The Journal of biological chemistry*, **292**:17577–17586. ISSN 1083-351X.
- Li Z., Yang C.S., Nakashima K. & Rana T.M. (2011) Small rna-mediated regulation of ips cell generation. *The EMBO journal*, **30**:823–834. ISSN 1460-2075.
- Liao Y., Smyth G.K. & Shi W. (2014) featurecounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **30**:923–930. ISSN 1367-4811.
- Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engel P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S. & Johnson J.M. (2005) Microarray analysis shows that some micrnas downregulate large numbers of target mrnas. *Nature*, **433**:769–773. ISSN 1476-4687.
- Lindeman R.E., Gearhart M.D., Minkina A., Krentz A.D., Bardwell V.J. & Zarkower D. (2015) Sexual cell-fate reprogramming in the ovary by dmrt1. *Current biology : CB*, **25**:764–771. ISSN 1879-0445.
- Liu C.F., Liu C. & Yao H.H.C. (2010) Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. *Current topics in developmental biology*, **90**:263–290. ISSN 1557-8933.

- Liu D., Li L., Fu H., Li S. & Li J. (2012) Inactivation of *dicer1* has a severe cumulative impact on the formation of mature germ cells in mouse testes. *Biochemical and biophysical research communications*, **422**:114–120.
- Lomelí H., Ramos-Mejía V., Gertsenstein M., Lobe C.G. & Nagy A. (2000) Targeted insertion of cre recombinase into the *tnap* gene: excision in primordial germ cells. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, **26**:116–117. ISSN 1526-954X.
- Lovell-Badge R. (1992) The role of *sry* in mammalian sex determination. *Ciba Foundation symposium*, **165**:162–79; discussion 179–82. ISSN 0300-5208.
- Luo X., Ikeda Y. & Parker K.L. (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, **77**:481–490. ISSN 0092-8674.
- Ma H., Zhang J. & Wu H. (2014) Designing ago2-specific sirna/shrna to avoid competition with endogenous mirnas. *Molecular therapy. Nucleic acids*, **3**:e176. ISSN 2162-2531.
- Maatouk D.M., DiNapoli L., Alvers A., Parker K.L., Taketo M.M. & Capel B. (2008a) Stabilization of beta-catenin in xy gonads causes male-to-female sex-reversal. *Human molecular genetics*, **17**:2949–2955. ISSN 1460-2083.
- Maatouk D.M., Loveland K.L., McManus M.T., Moore K. & Harfe B.D. (2008b) *Dicer1* is required for differentiation of the mouse male germline. *Biology of reproduction*, **79**:696–703. ISSN 0006-3363.
- Magoffin D.A. & Weitsman S.R. (1994) Insulin-like growth factor-i regulation of luteinizing hormone (lh) receptor messenger ribonucleic acid expression and lh-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biology of reproduction*, **51**:766–775. ISSN 0006-3363.
- Mao X., Fujiwara Y. & Orkin S.H. (1999) Improved reporter strain for monitoring cre recombinase-mediated dna excisions in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**:5037–5042. ISSN 0027-8424.
- Marrone A.K., Stolz D.B., Bastacky S.I., Kostka D., Bodnar A.J. & Ho J. (2014) MicroRNA-17 92 is required for nephrogenesis and renal function. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, **25**:1440–1452. ISSN 1533-3450.
- Massoud D., Barrionuevo F.J., Ortega E., Burgos M. & Jiménez R. (2014) The testis of greater white-toothed shrew *Crocidura russula* in southern european populations: a case of adaptive lack of seasonal involution? *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, **322**:304–315. ISSN 1552-5015.
- Matson C.K., Murphy M.W., Sarver A.L., Griswold M.D., Bardwell V.J. & Zarkower D. (2011a) *Dmrt1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, **476**:101–104. ISSN 1476-4687.
- Matsubara H., Takeuchi T., Nishikawa E., Yanagisawa K., Hayashita Y., Ebi H., Yamada H., Suzuki M., Nagino M., Nimura Y., Osada H. & Takahashi T. (2007) Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against mir-17-5p and mir-20a in lung cancers overexpressing

BIBLIOGRAFÍA

- mir-17-92. *Oncogene*, **26**:6099–6105. ISSN 0950-9232.
- Mattei M., Penault-Llorca F., Coulier F. & Birnbaum D. (1995) The human FGF9 gene maps to chromosomal region 13q11-q12. *Genomics*, **29**:811–2.
- McCarthy D.J., Chen Y. & Smyth G.K. (2012) Differential expression analysis of multifactor rna-seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic acids research*, **40**:4288–4297. ISSN 1362-4962.
- McClive P.J. & Sinclair A.H. (2003) Type ii and type ix collagen transcript isoforms are expressed during mouse testis development. *Biology of reproduction*, **68**:1742–1747. ISSN 0006-3363.
- McLaren A. (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Developmental biology*, **262**:1–15. ISSN 0012-1606.
- Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R. & Zhao M. (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, **111**:483–488. ISSN 0009-5915.
- Melo C.A. & Melo S.A. (2014) MicroRNA biogenesis: dicing assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **1182**:219–226. ISSN 1940-6029.
- Mendell J.T. (2008) myriad roles for the mir-17-92 cluster in development and disease. *Cell*, **133**:217–222. ISSN 1097-4172.
- Meng J., Holdcraft R.W., Shima J.E., Griswold M.D. & Braun R.E. (2005) Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**:16696–16700. ISSN 0027-8424.
- Menke D.B., Koubova J. & Page D.C. (2003) Sexual differentiation of germ cells in xx mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Developmental biology*, **262**:303–312. ISSN 0012-1606.
- Merchant-Larios H., Moreno-Mendoza N. & Buehr M. (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *The International journal of developmental biology*, **37**:407–415. ISSN 0214-6282.
- Merchant-Larios H. & Taketo T. (1991) Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *Journal of electron microscopy technique*, **19**:158–171. ISSN 0741-0581.
- Miller D., Brinkworth M. & Iles D. (2010) Paternal dna packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? dna, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction (Cambridge, England)*, **139**:287–301. ISSN 1741-7899.
- Minkina A., Matson C.K., Lindeman R.E., Ghyselinck N.B., Bardwell V.J. & Zarkower D. (2014) Dmrt1 protects male gonadal cells from retinoid-dependent sexual transdifferentiation. *Developmental cell*, **29**:511–520. ISSN 1878-1551.
- Mishima T., Takizawa T., Luo S.S., Ishibashi O., Kawahigashi Y., Mizuguchi Y., Ishikawa T., Mori M., Kanda T., Goto T. & Takizawa T. (2008) MicroRNA (mirna) cloning analysis reveals sex differences in mirna expression profiles between adult mouse testis and ovary. *Reproduction (Cambridge, England)*, **136**:811–822. ISSN 1741-7899.

- Mital P., Hinton B.T. & Dufour J.M. (2011) The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of reproduction*, **84**:851–858. ISSN 1529-7268.
- Miyamoto N., Yoshida M., Kuratani S., Matsuo I. & Aizawa S. (1997) Defects of urogenital development in mice lacking *emx2*. *Development (Cambridge, England)*, **124**:1653–1664. ISSN 0950-1991.
- Miyamoto Y., Taniguchi H., Hamel F., Silversides D.W. & Viger R.S. (2008) A *gata4/wt1* cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC molecular biology*, **9**:44. ISSN 1471-2199.
- Modzelewski A.J., Holmes R.J., Hilz S., Grimson A. & Cohen P.E. (2012) Ago4 regulates entry into meiosis and influences silencing of sex chromosomes in the male mouse germline. *Developmental cell*, **23**:251–264. ISSN 1878-1551.
- Mogilyansky E. & Rigoutsos I. (2013) The mir-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell death and differentiation*, **20**:1603–1614. ISSN 1476-5403.
- Mork L., Maatouk D.M., McMahon J.A., Guo J.J., Zhang P., McMahon A.P. & Capel B. (2012) Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biology of reproduction*, **86**:37. ISSN 1529-7268.
- Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S., Sharma A., Charroux B., Abel L., Rappsilber J., Mann M. & Dreyfuss G. (2002) mirnps: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development*, **16**:720–728. ISSN 0890-9369.
- Muto A., Iida A., Satoh S. & Watanabe S. (2009) The group e sox genes *sox8* and *sox9* are regulated by notch signaling and are required for Müller glial cell development in mouse retina. *Experimental eye research*, **89**:549–558. ISSN 1096-0007.
- Nagashima M., Shiseki M., Miura K., Hagiwara K., Linke S.P., Pedoux R., Wang X.W., Yokota J., Riabowol K. & Harris C.C. (2001) DNA damage-inducible gene *p33^{ing2}* negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**:9671–9676. ISSN 0027-8424.
- Nagy A. (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, **26**:99–109. ISSN 1526-954X.
- Nasrin N., Buggs C., Kong X.F., Carnazza J., Goebel M. & Alexander-Bridges M. (1991) DNA-binding properties of the product of the testis-determining gene and a related protein. *Nature*, **354**:317–320. ISSN 0028-0836.
- Nef S., Schaad O., Stallings N.R., Cederroth C.R., Pitetti J.L., Schaer G., Malki S., Dubois-Dauphin M., Boizet-Bonhoure B., Descombes P., Parker K.L. & Vassalli J.D. (2005) Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Developmental biology*, **287**:361–377. ISSN 0012-1606.

BIBLIOGRAFÍA

- Nef S., Verma-Kurvari S., Merenmies J., Vassalli J.D., Efstratiadis A., Accili D. & Parada L.F. (2003) Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*, **426**:291–295. ISSN 1476-4687.
- Nenoi M., Mita K., Ichimura S. & Kawano A. (1998) Higher frequency of concerted evolutionary events in rodents than in man at the polyubiquitin gene VNTR locus. *Genetics*, **148**:867–876. ISSN 0016-6731.
- Nguyen T.A., Jo M.H., Choi Y.G., Park J., Kwon S.C., Hohng S., Kim V.N. & Woo J.S. (2015) Functional anatomy of the human microprocessor. *Cell*, **161**:1374–1387. ISSN 1097-4172.
- Niu Z., Goodyear S.M., Rao S., Wu X., Tobias J.W., Avarbock M.R. & Brinster R.L. (2011) MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**:12740–12745. ISSN 1091-6490.
- Nowak J.A., Polak L., Pasolli H.A. & Fuchs E. (2008) Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell stem cell*, **3**:33–43. ISSN 1875-9777.
- Nunes-Düby S.E., Kwon H.J., Tirumalai R.S., Ellenberger T. & Landy A. (1998) Similarities and differences among 105 members of the int family of site-specific recombinases. *Nucleic acids research*, **26**:391–406. ISSN 0305-1048.
- Oatley J.M. & Brinster R.L. (2012) The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiological reviews*, **92**:577–595. ISSN 1522-1210.
- Obernosterer G., Leuschner P.J.F., Alenius M. & Martinez J. (2006) Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA (New York, N.Y.)*, **12**:1161–1167. ISSN 1355-8382.
- O'Bryan M.K., Takada S., Kennedy C.L., Scott G., Harada S.i., Ray M.K., Dai Q., Wilhelm D., de Kretser D.M., Eddy E.M., Koopman P. & Mishina Y. (2008) Sox8 is a critical regulator of adult sertoli cell function and male fertility. *Developmental biology*, **316**:359–370. ISSN 1095-564X.
- Okada C., Yamashita E., Lee S.J., Shibata S., Katahira J., Nakagawa A., Yoneda Y. & Tsukihara T. (2009) A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science (New York, N.Y.)*, **326**:1275–1279. ISSN 1095-9203.
- Olive V., Jiang I. & He L. (2010) mir-17-92, a cluster of mirnas in the midst of the cancer network. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **42**:1348–1354. ISSN 1878-5875.
- O'Rand M.G. & Romrell L.J. (1977) Appearance of cell surface auto- and isoantigens during spermatogenesis in the rabbit. *Developmental biology*, **55**:347–358. ISSN 0012-1606.
- Orisaka M., Tajima K., Tsang B.K. & Kotsuji F. (2009) Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of ovarian research*, **2**:9. ISSN 1757-2215.
- Ortogerero N., Hennig G.W., Langille C., Ro S., McCarrey J.R. & Yan W. (2013) Computer-assisted annotation of murine sertoli cell small rna transcriptome. *Biology of reproduction*, **88**:3. ISSN 1529-7268.

- Ota A., Tagawa H., Karnan S., Tsuzuki S., Karpas A., Kira S., Yoshida Y. & Seto M. (2004) Identification and characterization of a novel gene, c13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer research*, **64**:3087–3095. ISSN 0008-5472.
- Ottolenghi C., Omari S., Garcia-Ortiz J.E., Uda M., Crisponi L., Forabosco A., Pilia G. & Schlessinger D. (2005) Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Human molecular genetics*, **14**:2053–2062. ISSN 0964-6906.
- Pailhoux E., Vigier B., Chaffaux S., Servel N., Taourit S., Furet J.P., Fellous M., Grosclaude F., Crihiu E.P., Cotinot C. & Vaiman D. (2001) A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nature genetics*, **29**:453–458. ISSN 1061-4036.
- Palmer S.J. & Burgoyne P.S. (1991) In situ analysis of fetal, prepuberal and adult xx—xy chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, xy. *Development (Cambridge, England)*, **112**:265–268. ISSN 0950-1991.
- Palmiter R.D., Cole T.B., Quaife C.J. & Findley S.D. (1996) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**:14934–14939. ISSN 0027-8424.
- Panneerdoss S., Chang Y.F., Buddavarapu K.C., Chen H.I.H., Shetty G., Wang H., Chen Y., Kumar T.R. & Rao M.K. (2012) Androgen-responsive microRNAs in mouse sertoli cells. *PloS one*, **7**:e41146. ISSN 1932-6203.
- Papaioannou M.D., Lagarrigue M., Vejnar C.E., Rolland A.D., Kühne F., Aubry F., Schaad O., Fort A., Descombes P., Neerman-Arbez M., Guillou F., Zdobnov E.M., Pineau C. & Nef S. (2011) Loss of *dicer* in sertoli cells has a major impact on the testicular proteome of mice. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **10**:M900587MCP200. ISSN 1535-9484.
- Papaioannou M.D., Pitetti J.L., Ro S., Park C., Aubry F., Schaad O., Vejnar C.E., Kühne F., Descombes P., Zdobnov E.M., McManus M.T., Guillou F., Harfe B.D., Yan W., Jégou B. & Nef S. (2009) Sertoli cell *dicer* is essential for spermatogenesis in mice. *Developmental biology*, **326**:250–259. ISSN 1095-564X.
- Parma P., Radi O., Vidal V., Chaboissier M.C., Dellambra E., Valentini S., Guerra L., Schedl A. & Camerino G. (2006) *R-spondin1* is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nature genetics*, **38**:1304–1309. ISSN 1061-4036.
- Peirano R.I. & Wegner M. (2000) The glial transcription factor *sox10* binds to dna both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic acids research*, **28**:3047–3055. ISSN 1362-4962.
- Pepling M.E. & Spradling A.C. (1998) Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development (Cambridge, England)*, **125**:3323–3328. ISSN 0950-1991.
- Perera E.M., Martin H., Seeherunvong T., Kos L., Hughes I.A., Hawkins J.R. & Berkovitz G.D. (2001) *Tescalcin*, a novel gene encoding a putative ef-hand $ca(2+)$ -binding protein, *col9a3*, and *renin* are expressed in the mouse testis during the early stages of gonadal differentiation. *Endocrinology*, **142**:455–463. ISSN 0013-7227.

BIBLIOGRAFÍA

- Petrocca F., Vecchione A. & Croce C.M. (2008a) Emerging role of mir-106b-25/mir-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer research*, **68**:8191–8194. ISSN 1538-7445.
- Petrocca F., Visone R., Onelli M.R., Shah M.H., Nicoloso M.S., de Martino I., Iliopoulos D., Pillozzi E., Liu C.G., Negrini M., Cavazzini L., Volinia S., Alder H., Ruco L.P., Baldassarre G., Croce C.M. & Vecchione A. (2008b) E2f1-regulated micrnas impair tgfbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer cell*, **13**:272–286. ISSN 1878-3686.
- Polanco J.C., Wilhelm D., Davidson T.L., Knight D. & Koopman P. (2010) Sox10 gain-of-function causes xx sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Human molecular genetics*, **19**:506–516. ISSN 1460-2083.
- Poliseno L., Salmena L., Riccardi L., Fornari A., Song M.S., Hobbs R.M., Sportoletti P., Varmeh S., Egia A., Fedele G., Rameh L., Loda M. & Pandolfi P.P. (2010) Identification of the mir-106b 25 micrna cluster as a proto-oncogenic pten-targeting intron that cooperates with its host gene mcm7 in transformation. *Science signaling*, **3**:ra29. ISSN 1937-9145.
- Pontiggia A., Rimini R., Harley V.R., Goodfellow P.N., Lovell-Badge R. & Bianchi M.E. (1994) Sex-reversing mutations affect the architecture of sry-dna complexes. *The EMBO journal*, **13**:6115–6124. ISSN 0261-4189.
- de Pontual L., Yao E., Callier P., Faivre L., Drouin V., Cariou S., Van Haeringen A., Geneviève D., Goldenberg A., Oufadem M., Manouvrier S., Munnich A., Vidigal J.A., Vekemans M., Lyonnet S., Henrion-Caude A., Ventura A. & Amiel J. (2011) Germline deletion of the mir-17-92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. *Nature genetics*, **43**:1026–1030. ISSN 1546-1718.
- Poulat F., Girard F., Chevron M.P., Gozé C., Rebillard X., Calas B., Lamb N. & Berta P. (1995) Nuclear localization of the testis determining gene product sry. *The Journal of cell biology*, **128**:737–748. ISSN 0021-9525.
- Preall J.B. & Sontheimer E.J. (2005) Rnai: Risc gets loaded. *Cell*, **123**:543–545. ISSN 0092-8674.
- Qian S., Ding J.Y., Xie R., An J.H., Ao X.J., Zhao Z.G., Sun J.G., Duan Y.Z., Chen Z.T. & Zhu B. (2008) Micrna expression profile of bronchioalveolar stem cells from mouse lung. *Biochemical and biophysical research communications*, **377**:668–673. ISSN 1090-2104.
- Qin Y. & Bishop C.E. (2005) Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of sry. *Human molecular genetics*, **14**:1221–1229. ISSN 0964-6906.
- Qin Y., Kong L.k., Poirier C., Truong C., Overbeek P.A. & Bishop C.E. (2004) Long-range activation of sox9 in odd sex (ods) mice. *Human molecular genetics*, **13**:1213–1218. ISSN 0964-6906.
- Rakoczy J., Fernandez-Valverde S.L., Glazov E.A., Wainwright E.N., Sato T., Takada S., Combes A.N., Korbie D.J., Miller D., Grimmond S.M., Little M.H., Asahara H., Mattick J.S., Taft R.J. & Wilhelm D. (2013) Micrnas-140-5p/140-3p modulate leydig cell numbers

- in the developing mouse testis. *Biology of reproduction*, **88**:143. ISSN 1529-7268.
- Rastetter R.H., Bernard P., Palmer J.S., Chassot A.A., Chen H., Western P.S., Ramsay R.G., Chaboissier M.C. & Wilhelm D. (2014) Marker genes identify three somatic cell types in the fetal mouse ovary. *Developmental biology*, **394**:242–252. ISSN 1095-564X.
- Raymond C.S., Kettlewell J.R., Hirsch B., Bardwell V.J. & Zarkower D. (1999) Expression of *dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Developmental biology*, **215**:208–220. ISSN 0012-1606.
- Raymond C.S., Murphy M.W., O’Sullivan M.G., Bardwell V.J. & Zarkower D. (2000) *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes & development*, **14**:2587–2595. ISSN 0890-9369.
- Real F.M., Sekido R., Lupiáñez D.G., Lovell-Badge R., Jiménez R. & Burgos M. (2013) A microRNA (*mmu-mir-124*) prevents *sox9* expression in developing mouse ovarian cells. *Biology of reproduction*, **89**:78. ISSN 1529-7268.
- Rebsamen M., Pochini L., Stasyk T., de Araújo M.E.G., Galluccio M., Kandasamy R.K., Snijder B., Fauster A., Rudashevskaya E.L., Bruckner M., Scorzoni S., Filipek P.A., Huber K.V.M., Bigenzahn J.W., Heinz L.X., Kraft C., Bennett K.L., Indiveri C., Huber L.A. & Superti-Furga G. (2015) *SLC38a9* is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature*, **519**:477–481. ISSN 1476-4687.
- Reginensi A., Clarkson M., Neirijnck Y., Lu B., Ohyama T., Groves A.K., Sock E., Wegner M., Costantini F., Chaboissier M.C. & Schedl A. (2011) *Sox9* controls epithelial branching by activating ret effector genes during kidney development. *Human molecular genetics*, **20**:1143–1153. ISSN 1460-2083.
- Rex M., Uwanogho D., Cartwright E., Pearl G., Sharpe P.T. & Scotting P.J. (1994) *Sox* gene expression during neuronal development. *Biochemical Society transactions*, **22**:252S. ISSN 0300-5127.
- Richardson L.L., Kleinman H.K. & Dym M. (1995) Basement membrane gene expression by sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biology of reproduction*, **52**:320–330. ISSN 0006-3363.
- Rigoutsos I. (2009) New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer research*, **69**:3245–3248. ISSN 1538-7445.
- Rizzoti K., Akiyama H. & Lovell-Badge R. (2013) Mobilized adult pituitary stem cells contribute to endocrine regeneration in response to physiological demand. *Cell stem cell*, **13**:419–432. ISSN 1875-9777.
- Ro S., Park C., Sanders K.M., McCarrey J.R. & Yan W. (2007) Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental biology*, **311**:592–602. ISSN 1095-564X.
- Robinson M.D., McCarthy D.J. & Smyth G.K. (2010) *edgeR*: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **26**:139–140. ISSN 1367-4811.

BIBLIOGRAFÍA

- Romero Y., Meikar O., Papaioannou M.D., Conne B., Grey C., Weier M., Pralong F., De Massy B., Kaessmann H., Vassalli J.D., Kotaja N. & Nef S. (2011) Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. *PloS one*, **6**:e25241. ISSN 1932-6203.
- de Rooij D.G. & Russell L.D. (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology*, **21**:776–798. ISSN 0196-3635.
- Ruby J.G., Jan C.H. & Bartel D.P. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass drosha processing. *Nature*, **448**:83–86. ISSN 1476-4687.
- Russell W.M.S., Burch R.L. & Hume C.W. (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen London.
- Sadovsky Y., Crawford P.A., Woodson K.G., Polish J.A., Clements M.A., Turtelotte L.M., Simburger K. & Milbrandt J. (1995) Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express p450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**:10939–10943. ISSN 0027-8424.
- Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.
- Sauer B. & Henderson N. (1988) Site-specific dna recombination in mammalian cells by the cre recombinase of bacteriophage p1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**:5166–5170. ISSN 0027-8424.
- Schepers G., Wilson M., Wilhelm D. & Koopman P. (2003) Sox8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with sf1 to activate the amh promoter in vitro. *The Journal of biological chemistry*, **278**:28101–28108. ISSN 0021-9258.
- Schepers G.E., Bullejos M., Hosking B.M. & Koopman P. (2000) Cloning and characterisation of the sry-related transcription factor gene sox8. *Nucleic acids research*, **28**:1473–1480. ISSN 1362-4962.
- Schepers G.E., Teasdale R.D. & Koopman P. (2002) Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Developmental cell*, **3**:167–170. ISSN 1534-5807.
- Schmahl J. & Capel B. (2003) Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Developmental biology*, **258**:264–276. ISSN 0012-1606.
- Schmidt D., Ovitt C.E., Anlag K., Fehsenfeld S., Gredsted L., Treier A.C. & Treier M. (2004) The murine winged-helix transcription factor foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development (Cambridge, England)*, **131**:933–942. ISSN 0950-1991.
- Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N. & Zamore P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the rna1 enzyme complex. *Cell*, **115**:199–208. ISSN 0092-8674.

- Scott C.E., Wynn S.L., Sesay A., Cruz C., Cheung M., Gomez Gavira M.V., Booth S., Gao B., Cheah K.S.E., Lovell-Badge R. & Briscoe J. (2010) Sox9 induces and maintains neural stem cells. *Nature neuroscience*, **13**:1181–1189. ISSN 1546-1726.
- Segev N. & Cohen G. (1981) Control of circularization of bacteriophage p1 dna in escherichia coli. *Virology*, **114**:333–342. ISSN 0042-6822.
- Sekido R., Bar I., Narváez V., Penny G. & Lovell-Badge R. (2004) Sox9 is up-regulated by the transient expression of sry specifically in sertoli cell precursors. *Developmental biology*, **274**:271–279. ISSN 0012-1606.
- Sekido R. & Lovell-Badge R. (2008) Sex determination involves synergistic action of sry and sfl on a specific sox9 enhancer. *Nature*, **453**:930–934. ISSN 1476-4687.
- Sekido R. & Lovell-Badge R. (2013) Genetic control of testis development. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, **7**:21–32. ISSN 1661-5433.
- Selbach M., Schwanhäusser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R. & Rajewsky N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by micrnas. *Nature*, **455**:58–63. ISSN 1476-4687.
- Seymour P.A., Freude K.K., Tran M.N., Mayes E.E., Jensen J., Kist R., Scherer G. & Sander M. (2007) Sox9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**:1865–1870. ISSN 0027-8424.
- Sharp P.A., Sugden B. & Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in haemophilus parainfluenzae using analytical agarose–ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**:3055–3063. ISSN 0006-2960.
- Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C. & Fisher J.S. (2003) Proliferation and functional maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction (Cambridge, England)*, **125**:769–784. ISSN 1470-1626.
- Shen W.H., Moore C.C., Ikeda Y., Parker K.L. & Ingraham H.A. (1994) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell*, **77**:651–661. ISSN 0092-8674.
- Shyu A.B., Wilkinson M.F. & van Hoof A. (2008) Messenger rna regulation: to translate or to degrade. *The EMBO journal*, **27**:471–481. ISSN 1460-2075.
- Morais da Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A. & Lovell-Badge R. (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature genetics*, **14**:62–68. ISSN 1061-4036.
- Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R. & Goodfellow P.N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved dna-binding motif. *Nature*, **346**:240–244. ISSN 0028-0836.

BIBLIOGRAFÍA

- Singh A.P., Cummings C.A., Mishina Y. & Archer T.K. (2013) Sox8 regulates permeability of the blood-testes barrier that affects adult male fertility in the mouse. *Biology of reproduction*, **88**:133. ISSN 1529-7268.
- Siomi H. & Siomi M.C. (2010) Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular cell*, **38**:323–332. ISSN 1097-4164.
- Slepkov E.R., Rainey J.K., Li X., Liu Y., Cheng F.J., Lindhout D.A., Sykes B.D. & Fliegel L. (2005) Structural and functional characterization of transmembrane segment IV of the NHE1 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.*, **280**:17863–17872. ISSN 0021-9258.
- Small E.M., Frost R.J.A. & Olson E.N. (2010) MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*, **121**:1022–1032. ISSN 1524-4539.
- Small E.M. & Olson E.N. (2011) Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*, **469**:336–342. ISSN 1476-4687.
- Smith C.A. & Sinclair A.H. (2004) Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **26**:120–132. ISSN 0265-9247.
- Snyder E.M., Small C. & Griswold M.D. (2010) Retinoic acid availability drives the asynchronous initiation of spermatogonial differentiation in the mouse. *Biology of reproduction*, **83**:783–790. ISSN 1529-7268.
- Sock E., Schmidt K., Hermanns-Borgmeyer I., Bösl M.R. & Wegner M. (2001) Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor sox8. *Molecular and cellular biology*, **21**:6951–6959. ISSN 0270-7306.
- Soriano P. (1999) Generalized lacz expression with the rosa26 cre reporter strain. *Nature genetics*, **21**:70–71. ISSN 1061-4036.
- Soumillon M., Necsulea A., Weier M., Brauwand D., Zhang X., Gu H., Barthès P., Kokkinaki M., Nef S., Gnirke A., Dym M., de Massy B., Mikkelsen T.S. & Kaessmann H. (2013) Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell reports*, **3**:2179–2190. ISSN 2211-1247.
- Sree S., Radhakrishnan K., Indu S. & Kumar P.G. (2014) Dramatic changes in 67 miRNAs during initiation of first wave of spermatogenesis in mus musculus testis: global regulatory insights generated by miRNA-mRNA network analysis. *Biology of reproduction*, **91**:69. ISSN 1529-7268.
- Srinivas S., Watanabe T., Lin C.S., William C.M., Tanabe Y., Jessell T.M. & Costantini F. (2001) Cre reporter strains produced by targeted insertion of eyfp and ecfp into the rosa26 locus. *BMC developmental biology*, **1**:4. ISSN 1471-213X.
- Stevanović M., Lovell-Badge R., Collignon J. & Goodfellow P.N. (1993) Sox3 is an x-linked gene related to sry. *Human molecular genetics*, **2**:2013–2018. ISSN 0964-6906.
- Stolt C.C., Lommes P., Friedrich R.P. & Wegner M. (2004) Transcription factors sox8 and sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte

- te development despite functional redundancy. *Development (Cambridge, England)*, **131**:2349–2358. ISSN 0950-1991.
- Stolt C.C., Lommes P., Sock E., Chaboissier M.C., Schedl A. & Wegner M. (2003) The sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes & development*, **17**:1677–1689. ISSN 0890-9369.
- Stolt C.C., Schmitt S., Lommes P., Sock E. & Wegner M. (2005) Impact of transcription factor sox8 on oligodendrocyte specification in the mouse embryonic spinal cord. *Developmental biology*, **281**:309–317. ISSN 0012-1606.
- Suh M.R., Lee Y., Kim J.Y., Kim S.K., Moon S.H., Lee J.Y., Cha K.Y., Chung H.M., Yoon H.S., Moon S.Y., Kim V.N. & Kim K.S. (2004) Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental biology*, **270**:488–498. ISSN 0012-1606.
- Sun Y., Yu H., Zheng D., Cao Q., Wang Y., Harris D. & Wang Y. (2011) Sudan black b reduces autofluorescence in murine renal tissue. *Archives of pathology & laboratory medicine*, **135**:1335–1342. ISSN 1543-2165.
- Svingen T. & Koopman P. (2013) Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes & development*, **27**:2409–2426. ISSN 1549-5477.
- Swain A. & Lovell-Badge R. (1999) Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes & development*, **13**:755–767. ISSN 0890-9369.
- Szklarczyk R., Wanschers B.F., Cuypers T.D., Esseling J.J., Riemersma M., van den Brand M.A., Gloerich J., La-sonder E., van den Heuvel L.P., Nijtmans L.G. & Huynen M.A. (2012) Iterative orthology prediction uncovers new mitochondrial proteins and identifies C12orf62 as the human ortholog of COX14, a protein involved in the assembly of cytochrome c oxidase. *Genome Biol.*, **13**:R12. ISSN 1474-760X.
- Takada S., Berezikov E., Choi Y.L., Yamashita Y. & Mano H. (2009) Potential role of mir-29b in modulation of dnmt3a and dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA (New York, N.Y.)*, **15**:1507–1514. ISSN 1469-9001.
- Tanida I., Yamasaki M., Komatsu M. & Ueno T. (2012) The FAP motif within human ATG7, an autophagy-related E1-like enzyme, is essential for the E2-substrate reaction of LC3 lipidation. *Autophagy*, **8**:88–97. ISSN 1554-8635.
- Tevosian S.G., Albrecht K.H., Crispino J.D., Fujiwara Y., Eicher E.M. & Orkin S.H. (2002) Gonadal differentiation, sex determination and normal sry expression in mice require direct interaction between transcription partners gata4 and fog2. *Development (Cambridge, England)*, **129**:4627–4634. ISSN 0950-1991.
- Thomson J.M., Parker J., Perou C.M. & Hammond S.M. (2004) A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nature methods*, **1**:47–53. ISSN 1548-7091.
- Tomizuka K., Horikoshi K., Kitada R., Sugawara Y., Iba Y., Kojima A., Yoshitome A., Yamawaki K., Amagai M., Inoue A., Oshima T. & Kakitani M. (2008) R-spondin1 plays an essential role in ova-

BIBLIOGRAFÍA

- rian development through positively regulating wnt-4 signaling. *Human molecular genetics*, **17**:1278–1291. ISSN 1460-2083.
- Tong M.H., Mitchell D., Evanoff R. & Griswold M.D. (2011) Expression of mirlet7 family micrnas in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice. *Biology of reproduction*, **85**:189–197. ISSN 1529-7268.
- Tong M.H., Mitchell D.A., McGowan S.D., Evanoff R. & Griswold M.D. (2012) Two mirna clusters, mir-17-92 (mircl) and mir-106b-25 (mircl3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice. *Biology of reproduction*, **86**:72. ISSN 1529-7268.
- Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D.R., Pimentel H., Salzberg S.L., Rinn J.L. & Pachter L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of rna-seq experiments with tophat and cufflinks. *Nature protocols*, **7**:562–578. ISSN 1750-2799.
- Tripiciano A., Filippini A., Ballarini F. & Palombi F. (1998) Contractile response of peritubular myoid cells to prostaglandin f2alpha. *Molecular and cellular endocrinology*, **138**:143–150. ISSN 0303-7207.
- Tseng S.F., Chang C.Y., Wu K.J. & Teng S.C. (2005) Importin KPNA2 is required for proper nuclear localization and multiple functions of NBS1. *J. Biol. Chem.*, **280**:39594–39600. ISSN 0021-9258.
- Tsitsiou E. & Lindsay M.A. (2009) micrnas and the immune response. *Current opinion in pharmacology*, **9**:514–520. ISSN 1471-4973.
- Tung P.S. & Fritz I.B. (1978) Specific surface antigens on rat pachytene spermatocytes and successive classes of germinal cells. *Developmental biology*, **64**:297–315. ISSN 0012-1606.
- Turcatel G., Rubin N., Menke D.B., Martin G., Shi W. & Warburton D. (2013) Lung mesenchymal expression of sox9 plays a critical role in tracheal development. *BMC biology*, **11**:117. ISSN 1741-7007.
- Uhlenhaut N.H., Jakob S., Anlag K., Eisenberger T., Sekido R., Kress J., Treier A.C., Klugmann C., Klasen C., Holter N.I., Riethmacher D., Schütz G., Cooney A.J., Lovell-Badge R. & Treier M. (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by foxl2 ablation. *Cell*, **139**:1130–1142. ISSN 1097-4172.
- Vainio S., Heikkilä M., Kispert A., Chin N. & McMahon A.P. (1999) Female development in mammals is regulated by wnt-4 signalling. *Nature*, **397**:405–409. ISSN 0028-0836.
- Val P., Lefrançois-Martinez A.M., Veyssièrre G. & Martinez A. (2003) Sf-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nuclear receptor*, **1**:8. ISSN 1478-1336.
- Veitia R.A. (2010) Foxl2 versus sox9: a lifelong "battle of the sexes". *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **32**:375–380. ISSN 1521-1878.
- Ventura A., Young A.G., Winslow M.M., Lintault L., Meissner A., Erkeland S.J., Newman J., Bronson R.T., Crowley D., Stone J.R., Jaenisch R., Sharp P.A. & Jacks T. (2008) Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the mir-17 through 92 family of

- mirna clusters. *Cell*, **132**:875–886. ISSN 1097-4172.
- Vidal V.P., Chaboissier M.C., de Rooij D.G. & Schedl A. (2001) Sox9 induces testis development in xx transgenic mice. *Nature genetics*, **28**:216–217. ISSN 1061-4036.
- Vidal V.P.I., Chaboissier M.C., Lützkendorf S., Cotsarelis G., Mill P., Hui C.C., Ortonne N., Ortonne J.P. & Schedl A. (2005) Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Current biology : CB*, **15**:1340–1351. ISSN 0960-9822.
- Vogl A.W., Vaid K.S. & Guttman J.A. (2008) The sertoli cell cytoskeleton. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*.
- Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F.D., Keutel J., Hustert E., Wolf U., Tommerup N., Schempp W. & Scherer G. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the sry-related gene sox9. *Cell*, **79**:1111–1120. ISSN 0092-8674.
- Wainwright E.N., Jorgensen J.S., Kim Y., Truong V., Bagheri-Fam S., Davidson T., Svingen T., Fernandez-Valverde S.L., McClelland K.S., Taft R.J., Harley V.R., Koopman P. & Wilhelm D. (2013) Sox9 regulates microRNA mir-202-5p/3p expression during mouse testis differentiation. *Biology of reproduction*, **89**:34. ISSN 1529-7268.
- Wang H., Liu J., Zong Y., Xu Y., Deng W., Zhu H., Liu Y., Ma C., Huang L., Zhang L. & Qin C. (2010) mir-106b aberrantly expressed in a double transgenic mouse model for alzheimer's disease targets $\text{tgf-}\beta$ type ii receptor. *Brain research*, **1357**:166–174. ISSN 1872-6240.
- Wang J., Bai Y., Li H., Greene S.B., Klysiak E., Yu W., Schwartz R.J., Williams T.J. & Martin J.F. (2013a) MicroRNA-17-92, a direct ap-2 α transcriptional target, modulates t-box factor activity in orofacial clefting. *PLoS genetics*, **9**:e1003785. ISSN 1553-7404.
- Wang J., Li J., Gu Y., Xia Q., Song W., Zhang X., Yang Y., Wang W., Li H. & Zou K. (2018) Androgen Promotes Differentiation of PLZF+ Spermatogonia pool via Indirect Regulatory Pattern. *bioRxiv*, p. 297846.
- Wang X.N., Li Z.S., Ren Y., Jiang T., Wang Y.Q., Chen M., Zhang J., Hao J.X., Wang Y.B., Sha R.N., Huang Y., Liu X., Hu J.C., Sun G.Q., Li H.G., Xiong C.L., Xie J., Jiang Z.M., Cai Z.M., Wang J., Wang J., Huff V., Gui Y.T. & Gao F. (2013b) The wilms tumor gene, wt1, is critical for mouse spermatogenesis via regulation of sertoli cell polarity and is associated with non-obstructive azoospermia in humans. *PLoS genetics*, **9**:e1003645. ISSN 1553-7404.
- Warr N. & Greenfield A. (2012) The molecular and cellular basis of gonadal sex reversal in mice and humans. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, **1**:559–577. ISSN 1759-7692.
- van de Wetering M., Oosterwegel M., van Norren K. & Clevers H. (1993) Sox-4, an sry-like hmg box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *The EMBO journal*, **12**:3847–3854. ISSN 0261-4189.

BIBLIOGRAFÍA

- Wilhelm D. & Englert C. (2002) The wilms tumor suppressor wt1 regulates early gonad development by activation of sfl. *Genes & development*, **16**:1839–1851. ISSN 0890-9369.
- Wilhelm D., Hiramatsu R., Mizusaki H., Widjaja L., Combes A.N., Kanai Y. & Koopman P. (2007) Sox9 regulates prostaglandin d synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *The Journal of biological chemistry*, **282**:10553–10560. ISSN 0021-9258.
- Wilhelm D., Martinson F., Bradford S., Wilson M.J., Combes A.N., Beverdam A., Bowles J., Mizusaki H. & Koopman P. (2005) Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Developmental biology*, **287**:111–124. ISSN 0012-1606.
- Wilson M.J., Jeyasuria P., Parker K.L. & Koopman P. (2005) The transcription factors steroidogenic factor-1 and sox9 regulate expression of vanin-1 during mouse testis development. *The Journal of biological chemistry*, **280**:5917–5923. ISSN 0021-9258.
- Wright E., Hargrave M.R., Christiansen J., Cooper L., Kun J., Evans T., Gangadharan U., Greenfield A. & Koopman P. (1995) The sry-related gene sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature genetics*, **9**:15–20. ISSN 1061-4036.
- Wu Q., Song R., Ortogero N., Zheng H., Evanoff R., Small C.L., Griswold M.D., Namekawa S.H., Royo H., Turner J.M. & Yan W. (2012) The rnase iii enzyme drosha is essential for microRNA production and spermatogenesis. *The Journal of biological chemistry*, **287**:25173–25190. ISSN 1083-351X.
- Xie R., Lin X., Du T., Xu K., Shen H., Wei F., Hao W., Lin T., Lin X., Qin Y., Wang H., Chen L., Yang S., Yang J., Rong X., Yao K., Xiao D., Jia J. & Sun Y. (2016) Targeted disruption of mir-17-92 impairs mouse spermatogenesis by activating mtor signaling pathway. *Medicine*, **95**:e2713. ISSN 1536-5964.
- Yan N., Lu Y., Sun H., Tao D., Zhang S., Liu W. & Ma Y. (2007) A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction (Cambridge, England)*, **134**:73–79. ISSN 1470-1626.
- Yang Q.E., Racicot K.E., Kaucher A.V., Oatley M.J. & Oatley J.M. (2013) MicroRNAs 221 and 222 regulate the undifferentiated state in mammalian male germ cells. *Development (Cambridge, England)*, **140**:280–290. ISSN 1477-9129.
- Yao H.H.C., Matzuk M.M., Jorgez C.J., Menke D.B., Page D.C., Swain A. & Capel B. (2004) Follistatin operates downstream of wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **230**:210–215. ISSN 1058-8388.
- Ying Y. & Zhao G.Q. (2001) Cooperation of endoderm-derived bmp2 and extraembryonic ectoderm-derived bmp4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Developmental biology*, **232**:484–492. ISSN 0012-1606.
- Yoshida K., Kondoh G., Matsuda Y., Habu T., Nishimune Y. & Morita T. (1998)

- The mouse reca-like gene *dmc1* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Molecular cell*, **1**:707–718. ISSN 1097-2765.
- Yu Z., Raabe T. & Hecht N.B. (2005) MicroRNA *mirn122a* reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (*tnp2*) messenger rna (*mrna*) by *mrna* cleavage. *Biology of reproduction*, **73**:427–433. ISSN 0006-3363.
- Zarkower C.M.M.M.A.S.M.G.V.B.D. (2011b) *Dmrt1* (doublesex and mab-3 related transcription factor 1) conditional knockout expression analysis of p28 testes. *Gene Expression Omnibus*.
- Zhao L., Svingen T., Ng E.T. & Koopman P. (2015) Female-to-male sex reversal in mice caused by transgenic overexpression of *dmrt1*. *Development (Cambridge, England)*, **142**:1083–1088. ISSN 1477-9129.
- Zheng W., Zhang H., Gorre N., Risal S., Shen Y. & Liu K. (2014) Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Human molecular genetics*, **23**:920–928. ISSN 1460-2083.
- Zhou B., Ma Q., Rajagopal S., Wu S.M., Domian I., Rivera-Feliciano J., Jiang D., von Gise A., Ikeda S., Chien K.R. & Pu W.T. (2008) Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*, **454**:109–113. ISSN 1476-4687.
- Zhou Y., Zhang L., Ji H., Lu X., Xia J., Li L., Chen F., Bu H. & Shi Y. (2016) *Mir-17 92* ablation impairs liver regeneration in an estrogen-dependent manner. *Journal of cellular and molecular medicine*, **20**:939–948. ISSN 1582-4934.
- Zimmermann C., Romero Y., Warnefors M., Bilican A., Borel C., Smith L.B., Kotaja N., Kaessmann H. & Nef S. (2014) Germ cell-specific targeting of *dicer* or *dgcr8* reveals a novel role for endo-sirnas in the progression of mammalian spermatogenesis and male fertility. *PloS one*, **9**:e107023. ISSN 1932-6203.