

Mecanismos de regresión y activación testicular en
mamíferos con reproducción estacional: control
genético y susceptibilidad a cambios ambientales



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Miguel Lao Pérez

Tesis Doctoral

Octubre de 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Miguel Lao Pérez

ISBN: 978-84-1117-074-1

URI: <http://hdl.handle.net/10481/71170>

El presente trabajo se ha desarrollado en los laboratorios del Departamento de Genética situados en el Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada. La investigación realizada ha sido financiada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, mediante la concesión de una beca predoctoral “FPI” (BES-2016-076829). 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 del proyecto (CGL2015-67108-P)

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en las revistas *Animals* <https://doi.org/10.3390/ani11061639> y *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204851> y presentados en las I Jornadas Científicas del Centro de Investigación Biomédica.

Agradecimientos

Estoy muy orgulloso de haber pertenecido a este grupo de investigación del que he formado parte durante mi etapa predoctoral. Y es que es difícil dar con personas que sean capaces de transmitir tal cantidad de conocimientos tanto profesionales como personales que me han hecho crecer como investigador y como persona. La presente tesis es fruto de años de investigación, camino que ha estado lleno de esfuerzo e ilusión animado por la ayuda de muchas personas a las cuales quiero aprovechar este espacio para darles mi más sincera gratitud:

En primer lugar agradecer a mis directores los doctores Rafael Jiménez y Francisco J. Barrionuevo el haberme brindado la posibilidad de estar hoy aquí, el haberme apoyado con toda su experiencia profesional la cual me ha guiado a través de cada una de las etapas de este proyecto y también por ser las magníficas personas que son. Os estoy muy agradecido.

En segundo lugar al Dr. Miguel Burgos por haber entregado toda su paciencia y dedicación sin la cual no habría podido completarse este trabajo.

Al Dr. Darío J.G. Lupiáñez y a todos mis compañeros del Max Delbrück Center porque pese a que mi estancia estuvo marcada por el inicio de la pandemia, mantengo muy buenas experiencias de ella.

A mi tutor, el Dr. Manuel Martínez Bueno por su ayuda y disponibilidad.

A mis compañeros de Ciencias y del “105” el haber estado ahí cuando los he necesitado especialmente a Miriam, Álex y Dilamm, por su amistad y por haber sido grandes compañeros. Agradezco a Ana y Mohammed, del servicio de microscopía del CIBM, el haberme enseñado tanto durante esta etapa. También a todos los profesores del Departamento de Genética el haber colaborado al igual en mi formación, dándome buenos consejos y ayudándome en todo momento.

A Alicia, la persona que me ha apoyado en todo momento tanto profesional como personalmente.

A mis amigos del Norte “Los Ents”, con especial mención a Oscar y Edgar, que aunque les vea ocasionalmente, se que siempre están ahí.

A mis amigos del Sur, “Los Paduleños” de los cuales me siento orgulloso de poder contar con todos y cada uno de ellos, mencionando especialmente a Juanma, “Pichica” el cual ha demostrado con los años ser un amigo único, con el que he podido contar para lo bueno y para lo malo. *Viva el Padul!*

A mi “familia de Valdepeñas” por tenerme siempre como uno más y apoyarme en todo lo que he necesitado.

Y por supuesto a mi familia, tanto del Norte como del Sur, por todo el apoyo que he recibido por su parte, haberme formado como persona y haber logrado que llegue hasta aquí en el día de hoy. Especial agradecimiento a mis padres y mi hermano por ser los pilares fundamentales de mi vida, y en particular a mi madre, persona a la que tengo especial admiración y siempre ha sabido dárme los mejores consejos para seguir adelante.

Destacar a mis abuelos que tan importantes han sido y lo son en mi vida, a los que tengo el orgullo de llamar como segundos padres.

A todos ellos, MUCHAS GRACIAS.

En estas cuatro líneas quiero mencionar a los animales modelo de los que se ha servido este proyecto, y en general todos en los que se apoya la ciencia, ya que gracias a ellos no podrían desarrollarse las investigaciones científicas que tan necesarias son para este mundo.

Ω

Dedicado a mi Aitxitxa

Índice general

1	Resumen	1
2	Abstract	7
3	Introducción	11
3.1	Reproducción sexual	11
3.1.1	Estructura de los testículos y los epidídimos	11
3.1.2	Espermatogenesis	15
3.1.3	Uniones inter-celulares en el testículo	20
3.1.4	Privilegio inmunológico testicular	23
3.2	Reproducción estacional	25
3.2.1	Control de la reproducción estacional	29
3.3	Mecanismos de regresión testicular	37
3.3.1	Apoptosis celular	38
3.3.2	Descamación celular	40
3.4	Genes de interés en la regresión testicular	42
3.5	Nuevas especies para los estudios sobre reproducción esta- cional	46
4	Objetivos	53

5	Material y Métodos	55
5.1	Material analizado	55
5.1.1	Métodos de captura	56
5.1.2	Colección de los tejidos	59
5.1.3	Tratamiento de los tejidos	61
5.2	Métodos histológicos	62
5.2.1	Tinción Hematoxilina-Eosina	63
5.2.2	Técnicas inmunológicas	64
5.3	Métodos moleculares	73
5.4	Otros métodos	75
5.4.1	Medida de la concentración de testosterona en suero	75
5.5	Transcriptómica	76
5.5.1	<i>Microtus duodecimcostatus</i>	76
5.5.2	<i>Talpa occidentalis</i>	81
5.6	Soluciones	83
6	Resultados	87
6.1	<i>Hemiechinus auritus</i>	87
6.1.1	Los testículos de <i>Hemiechinus auritus</i> permanecen estériles durante el invierno	87
6.1.2	La espermatogénesis se interrumpe en paquitene en los testículos inactivos de <i>Hemiechinus auritus</i>	88
6.1.3	Los espermatoцитos primarios sufren apoptosis en el testículo inactivo de <i>Hemiechinus auritus</i>	91
6.1.4	Las células germinales se eliminan mediante desca- mación durante la regresión testicular de <i>Hemiechi- nus auritus</i>	96

6.1.5	Los niveles de testosterona sérica de <i>Hemiechinus auritus</i> están reducidos durante la temporada no reproductiva	99
6.2	<i>Microtus duodecimcostatus</i>	101
6.2.1	Expresión diferencial entre testículos activos e inactivos de <i>Microtus duodecimcostatus</i>	101
6.2.2	Rutas moleculares que controlan la adhesión celular en el epitelio germinativo están alteradas en los testículos inactivos de <i>M. duodecimcostatus</i>	105
6.2.3	El testículo inactivo de <i>M. duodecimcostatus</i> pierde el “inmunoprivilegio” que normalmente opera en un testículo funcional	110
6.3	<i>Talpa occidentalis</i>	113
6.3.1	Rutas moleculares que controlan la adhesión celular en el epitelio germinativo y la respuesta inmune están alteradas en los testículos inactivos de <i>T. occidentalis</i>	113
6.3.2	Cambios transcriptómicos al inicio de la regresión testicular en <i>Talpa occidentalis</i>	122
6.3.3	Análisis transcriptómico de la espermatogénesis temprana en el testículo inactivo de <i>Talpa occidentalis</i>	128
6.4	Análisis comparativo entre <i>T. occidentalis</i> y <i>M. duodecimcostatus</i>	129
7	Discusión	137
7.1	Regresión testicular en <i>Hemiechinus auritus</i>	137
7.2	Rutas moleculares alteradas en <i>Microtus duodecimcostatus</i> .	141
7.3	Rutas moleculares alteradas en <i>Talpa occidentalis</i>	145
7.4	Mecanismos responsables de la regresión testicular	149
8	Conclusiones	151

9 Conclusions	155
10 Material suplementario	159
Bibliografía	161

Índice de figuras

3.1	Localización de la BTB en el testículo	14
3.2	El eje hipotalámico-pituitario-gonadal	17
3.3	Uniones celulares	22
3.4	Efectos del fotoperiodo en la reproducción estacional	32
3.5	<i>Hemiechinus auritus</i>	47
3.6	<i>Talpa occidentalis</i>	48
3.7	<i>Microtus duodecimcostatus</i>	50
5.1	Mapa de captura de <i>Hemiechinus auritus</i>	57
5.2	Mapa de captura de <i>Microtus duodecimcostatus</i> y <i>Talpa occidentalis</i>	58
5.3	Coefficientes de correlación a nivel transcripcional entre ambas muestras	79
6.1	Comparación de tres parámetros morfométricos entre los grupos de verano e invierno de <i>H. auritus</i>	88
6.2	Histología de los testículos y los epidídimos de erizos orejados capturados en invierno y verano	89
6.3	Estudio de marcadores moleculares de células somáticas en testículos de <i>H. auritus</i>	90

6.4	Estudio de marcadores moleculares de células germinales en testículos de <i>H. auritus</i>	92
6.5	Micrografías a mayor aumento de la doble inmunofluorescencia para DMC1 y PCNA en testículos inactivos (Figura 6.4)	93
6.6	Estudio de la apoptosis en testículos activos e inactivos de <i>H. auritus</i>	94
6.7	Cuantificación de la apoptosis en testículos activos e inactivos.	94
6.8	Identificación de células apoptóticas en testículos inactivos de <i>H. auritus</i>	95
6.9	Descamación de las células germinales en el testículo en regresión	97
6.10	Ensayo TUNEL en un testículo en proceso de inactivación .	98
6.11	Patrón de expresión de varias moléculas de adhesión celular en el epitelio germinativo de testículos activos, en inactivación e inactivos de <i>H. auritus</i>	100
6.12	Concentración de testosterona sérica en individuos de <i>H. auritus</i>	101
6.13	Histología de los testículos activos e inactivos de <i>M. duodecimcostatus</i>	102
6.14	La espermatogénesis está interrumpida en el estadio de espermatogonia en testículos inactivos de <i>M. duodecimcostatus</i>	103
6.15	Diagrama de la prueba de expresión diferencial.	104
6.16	Análisis de ontología génica de los genes desregulados.	105
6.17	Análisis de asociación “genes-categorías” usando DEGs entre testículo activo e inactivo de <i>M. duodecimcostatus</i> , pertenecientes a la categoría asociada con la espermatogénesis.	107
6.18	Análisis de asociación “genes-categorías” usando DEGs entre testículo activo e inactivo de <i>M. duodecimcostatus</i> , pertenecientes a categorías asociadas con rutas moleculares implicadas en el control de la espermatogénesis y la adhesión celular.	108

6.19	Visualización de los genes expresados diferencialmente en la vía de señalización MAPK	109
6.20	Análisis de asociación “genes-categorías” usando DEGs entre testículo activo e inactivo de <i>M.duodecimcostatus</i> , pertenecientes a categorías asociadas con la activación del sistema inmunitario.	111
6.21	Visualización de los genes expresados diferencialmente de la vía de señalización del TNF	112
6.22	Regresión testicular en <i>T. occidentalis</i>	113
6.23	Análisis de clusterización de las muestras de testículo	115
6.24	Diagrama de dispersión tipo “volcano plot” mostrando genes con expresión diferencial entre testículos activos e inactivos de <i>T. occidentalis</i> antes de la normalización	116
6.25	Análisis de términos GO usando genes diferencialmente expresados entre testículos activos e inactivos de <i>T. occidentalis</i> antes de la normalización	117
6.26	Diagrama de dispersión tipo “volcano plot” mostrando genes con expresión diferencial entre testículos activos e inactivos de <i>T. occidentalis</i> después de la normalización	118
6.27	Análisis de términos GO usando genes diferencialmente expresados entre testículos activos e inactivos de <i>T. occidentalis</i> después de la normalización	119
6.28	Cnetplot de varios términos GO significativamente enriquecidos asociados a varias rutas moleculares	120
6.29	Cnetplot de varios términos GO significativamente enriquecidos asociados a la activación del sistema inmunitario	121
6.30	Inicio de la regresión testicular en <i>T. occidentalis</i>	122
6.31	Análisis de clusterización de las muestras de testículo	124
6.32	Diagrama de dispersión tipo “volcano plot” mostrando genes con expresión diferencial entre testículos activos y en activación de <i>T. occidentalis</i>	125

6.33	Diagrama de dispersión comparando los \log_2FC obtenidos tras la expresión génica diferencial entre los testículos activos/inactivos frente a la de los testículos activos/inactivos.	126
6.34	Análisis de términos GO usando genes diferencialmente expresados entre testículos activos e inactivando de <i>T. occidentalis</i> después de la normalización	127
6.35	Cnetplot de varios DEGs pertenecientes a varias rutas moleculares.	127
6.36	Análisis de las células germinales en el testículo inactivo de <i>T. occidentalis</i>	129
6.37	Análisis de las células germinales en el testículo inactivo de <i>T. occidentalis</i>	130
6.38	Comparación de temas biológicos obtenidos al analizar los Act-up-DEGs entre diferentes clústeres de células germinales	131
6.39	Comparación de temas biológicos obtenidos al analizar los Inact-up-DEGs entre diferentes clústeres de células germinales	132
6.40	Diagrama de dispersión comparando los \log_2FC de los DEGs entre testículos activos e inactivos de <i>T. occidentalis</i> frente a los de <i>M. duodecimcostatus</i>	134
6.41	Análisis de términos GO de genes que se encuentran diferencialmente expresados en ambos, <i>T. occidentalis</i> y <i>M. duodecimcostatus</i>	134
6.42	Análisis de asociación “genes-categorías” usando DEGs de ambos, <i>T. occidentalis</i> y <i>M. duodecimcostatus</i> , pertenecientes a varias rutas moleculares.	135
6.43	Análisis de asociación “genes-categorías” usando DEGs de ambos, <i>T. occidentalis</i> y <i>M. duodecimcostatus</i> , pertenecientes a categorías asociadas con el sistema inmunitario	136

Índice de cuadros

5.1	Ejemplares de <i>Hemiechinus auritus</i> analizados	59
5.2	Ejemplares de <i>Microtus duodecimcostatus</i> analizados	60
5.3	Ejemplares de <i>Talpa occidentalis</i> analizados	61
5.4	Anticuerpos primarios empleados	69
5.5	Anticuerpos secundarios empleados	69

Abreviaturas

β -CAT: β -catenina

ACTA2: α -actina del músculo liso

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMH: Hormona antimülleriana o *Mis* (del inglés, *Müllerian Inhibiting Substance*)

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP (del inglés *AMP-activated protein kinase*)

API: Interfaz de programación de aplicaciones (del inglés *application programming interface*)

AR: Receptor de andrógenos (del inglés, *Androgen receptor*)

AREs: Elementos de respuesta androgénica (del inglés, *androgen response elements*)

ARN: Ácido ribonucleico

Act-up-DEG: Genes sobreexpresados en testículos activos

BEB: Barrera hemato-epididimaria (del inglés *blood-epididymis barrier*)

BRCA2: Breast Cancer Type 2 susceptibility protein

BTB: Barrera hemato-testicular (del inglés, *blood testis barrier*)

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico (del inglés, *cyclic adenosine monophosphate*)

CD95: Receptor Fas

Célula NK: Célula asesina natural (del inglés *natural killer*)

CLDN11: Claudina 11

CNX43: Conexina 43

DAB: Diaminobencidina

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

DEG: Genes expresados diferencialmente (del inglés, *differentially expressed genes*)

DMC1: DNA meiotic recombinase 1

DMRT1: Doublesex and Mab-3 related transcription factor 1

dpp: Días post parto

DPX: DePeX

dUTP: Deoxyuridine Triphosphate

EDS: Dimetanosulfonato de etano

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ERK: Quinasas reguladas por señal extracelular (del ingles, *Extracellular signal-regulated kinases*)

ES: Especializaciones ectoplasmáticas (del inglés, *ectoplasmic specialisation*)

FDR: Tasa de falsos descubrimientos (del inglés *false discovery rate*)

FOXL2: Forkhead box L2

FSH: Hormona foliculoestimulante (del ingles, *follicle-stimulating hormone*)

FasL: Ligando del receptor Fas

GDF9: Factor de diferenciación del crecimiento-9 (del inglés, *Growth differentiation factor-9*)

GO: Ontología génica (del inglés, *gene ontology*)

GPR54: Receptor de kisspeptina

GnIH: Hormona inhibidora de gonadotropina (del inglés, *Gonadotropin inhibitory hormone*)

GnRH I y II: Hormona liberadora de gonadotropina (del inglés, *Gonadotrophin releasing hormone*)

GTP: Guanosín trifosfato

HPG: Eje hipotálamo-pituitaria-gónada

IDO: Indolamina 2,3 dioxigenasa

IGF-I: Factor de crecimiento insulínico 1 (del inglés, *insulin-like growth factors*)

IgG: Inmunoglobulina G

Inact-up-DEG: Genes sobreexpresados en testículos inactivos

JNK: Quinasas c-Jun N-terminal

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

KISS-I: Kisspeptina 1

KO: *Knockout*

LAM: Laminina

LH: Hormona luteinizante (del inglés, *Luteinizing hormone*)

MAPK: Quinasas de proteínas activadas por mitógenos (del inglés, *mitogen-activated protein kinases*)

MDS: Escalado multidimensional (del inglés (multidimensional scaling))

MIF: Factor inhibidor de la migración de macrófagos (del inglés, *migration inhibitory factor*)

MMR: Reparación de apareamientos incorrectos (del inglés *DNA mismatch repair*)

NCAD: N-cadherina

ORP: Protocolo de Oyster River (del inglés *Oyster River Protocol*)

Ods: Ratones XX Odsex

P450scc: Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol o también CYP11A1 (del inglés, *Cholesterol side-chain cleavage enzyme*)

p.adjust: Valor P ajustado

PBS: Phosphate-buffered saline

PBT: Phosphate-buffered saline + Tween20

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación (del inglés, *Proliferating cell nuclear antigen*)

PVC: Policloruro de vinilo

RA: Ácido retinoico (del inglés *retinoic acid*)

SBB: Sudan Black

SER: Retículo endoplásmico liso (del inglés, *smooth endoplasmic reticulum*)

SOX9: SRY-related HMG box, gene 9

SRY: Sex determining region Y

TAE: Tris-acetato-EDTA

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta (del inglés, *transforming growth factor beta*)

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *Tumor necrosis factor*)

Tregs: Linfocitos T reguladores

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

WNT4: Wingless-type MMTV integration site family member 4

ZO-1, ZO-2, ZO-3: zonula occludens 1, 2, 3 respectivamente

1. Resumen

La reproducción estacional es la que se produce de forma discontinua a lo largo del año como resultado de la adaptación a las fluctuaciones ambientales resultante de las estaciones climáticas. Este comportamiento lo presentan numerosas especies de vertebrados que habitan en regiones templadas de la Tierra, concentrando así su esfuerzo reproductivo en aquellas estaciones del año que ofrecen mejores condiciones ambientales y garantizando que la descendencia nazca y crezca en los periodos más favorables. Las especies con reproducción estacional son capaces de detener y reanudar la gametogénesis de forma cíclica. Tanto los machos como las hembras experimentan cambios sustanciales en sus gónadas durante la transición entre los períodos reproductivos y no reproductivos. En los machos tiene lugar un proceso de regresión testicular que implica cambios importantes en la función testicular, viéndose alteradas la espermatogénesis, la androgénesis y el sistema inmunológico local. La mayor parte de los estudios realizados hasta el momento son incompletos pues sólo enfocan aspectos muy particulares de proceso en muchos casos (apoptosis, variaciones hormonales, ultraestructura, cambios morfológicos, dinámica de las moléculas de adhesión celular). Estudios completos que incluyan todas estas características sólo se han llevado a cabo en un número reducido de especies, como el topo ibérico, el armadillo de pelo largo y topillo mediterráneo.

En la presente tesis doctoral, hemos realizado un estudio completo del proceso de regresión testicular en una nueva especie, el erizo orejudo, *Hemiechinus auritus* con individuos procedentes del norte de Egipto. Nuestros resultados muestran que en esta especie el principal efector de regresión testicular es la descamación de las células germinales, como se ha descrito previamente tanto en el topo ibérico *Talpa occidentalis* como en el gran armadillo peludo *C. villosus*. La presencia de abundantes espermatoцитos primarios en el lumen, tanto de los túbulos seminíferos

1. RESUMEN

como de los epidídimos, indica que las células meióticas inmaduras se desprenden precozmente del epitelio seminífero. Posteriormente, estas células germinales que se han desprendido son eliminadas a través de la sección distal del tracto genito-urinario. Además encontramos que la apoptosis no es la causa principal de la pérdida de células germinales en el testículo en regresión de *H. auritus*, ya que hay un número muy reducido de células apoptóticas en dichos testículos. Sin embargo, la apoptosis sí juega un papel importante en los testículos inactivos, ya que es el principal mecanismo que elimina los espermatozoides primarios que alcanzan el estadio de paquitene. Por otro lado, hemos encontrado que la expresión de moléculas de adhesión celular está alterada tanto en el epitelio germinativo de los testículos en regresión como los inactivos, sugiriendo que la adhesión entre células de Sertoli y entre las células de Sertoli y las células germinales está comprometida en los testículos en regresión, explicando así el desprendimiento de células germinales que tiene lugar durante este periodo. Finalmente, al igual que ocurre en todas las especies estudiadas hasta la fecha, los niveles de testosterona circulantes están reducidos en los individuos inactivos de *H. auritus*, indicando que la reducción de la concentración de andrógenos es probablemente la señal hormonal que induce la eliminación estacional de las células germinales y la pérdida de la adhesión celular en el epitelio germinativo de mamíferos.

A partir de los diferentes trabajos realizados en mamíferos, como el realizado en la presente tesis doctoral, en los que se estudian los cambios que los testículos sufren durante su ciclo reproductivo anual se extrae la conclusión de que es evidente que no existe un mecanismo único de regresión testicular. Actualmente se han identificado dos procesos celulares principales por los que se eliminan masivamente las células germinales durante el proceso de regresión testicular: la apoptosis y la descamación de células germinales. A pesar de ello, el control genético de estos cambios testiculares es poco conocido, principalmente por la complejidad de las rutas genéticas que operan en un tipo celular específico de testículo y la señalización cruzada entre los diferentes tipos celulares. En este sentido, los estudios de perfiles de expresión pueden proporcionar una visión integrada de las rutas moleculares interactivas que operan en el testículo, y también pueden darnos información sobre cuáles de ellas están afectadas en los testículos con regresión. En la presente tesis doctoral hemos analizado

el transcriptoma testicular de dos especies para las que previamente habíamos realizado un estudio histológico, inmunohistológico, funcional y hormonal de los cambios testiculares a lo largo de su ciclo reproductivo, el topillo mediterráneo, *Microtus duodecimcostatus* y el topo ibérico *Talpa occidentalis*.

Para *M. duodecimcostatus* hemos encontrado que las rutas de señalización MAPK/ERK1/2, WNT, TGF- β , Ca²⁺ citosólico y PI3K están desreguladas en el testículo inactivo. Todas estas rutas operan en las células de Sertoli y están implicadas en la regulación de la espermatogénesis y en la dinámica de las uniones estrechas y adherentes presentes en la barrera hemato-testicular (BTB). Nuestro análisis demostró que MAPK/ERK1/2, una ruta de señalización necesaria para la proliferación celular mitótica y meiótica, desempeña un papel central en este proceso. Estudios anteriores han demostrado que la testosterona modula la actividad de la ruta de señalización MAPK/ERK en las células de Sertoli, indicando que la disminución de los niveles séricos de testosterona en los machos inactivos de *M. duodecimcostatus* afecta a la regulación por parte de las células de Sertoli de varias rutas moleculares interconectadas que inducen: a) alteraciones del ciclo espermatogénico, b) desregulación de las moléculas de adhesión celular y c) alteración de la dinámica de la BTB.

El testículo está sometido a un entorno inmunológico especial conocido como “inmuno-privilegio” que protege a las células germinales de un ataque autoinmune. Este “inmuno-privilegio” se basa en: a) la formación de la BTB en el epitelio germinativo, b) la capacidad disminuida de la población de macrófagos testiculares para inducir una respuesta inflamatoria y c) la expresión constitutiva de citoquinas antiinflamatorias por parte de las células inmunitarias y otras células somáticas. Nuestro análisis transcriptómico indicó que la población de macrófagos estaba activada en el testículo inactivo de *M. duodecimcostatus*. Estudios previos han mostrado que la testosterona es esencial para mantener el “inmuno-privilegio” testicular en condiciones fisiológicas, por lo que podemos concluir que los niveles reducidos de testosterona en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus* pueden inducir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos y, probablemente, por otros tipos de células somáticas (por ejemplo, Sertoli y células mioides peritubulares) que activan a los macrófagos.

1. RESUMEN

Resulta interesante que el estudio transcriptómico de los testículos de *T. occidentalis* también reveló que procesos biológicos como la adhesión celular y el ensamblaje de las uniones celulares, así como varias rutas moleculares, incluyendo MAPK, ERK1/2, TGF- β , Ca²⁺ citosólico, PI3K, GTPasa y TNF estaban alteradas en los testículos inactivos. Por otro lado, el análisis transcriptómico también reveló que el sistema inmunitario se activaba en los testículos inactivos de *T. occidentalis*. Teniendo en cuenta todas estas observaciones, sugerimos que, como ocurre en *M. duodecimcostatus*, los bajos niveles de testosterona en los testículos inactivos de *T. occidentalis* conducen a la pérdida del “inmuno-privilegio” del testículo activo, hecho que se manifiesta por la permeabilidad de la BTB y el aumento de la producción de citoquinas por parte de la población de macrófagos (y quizás de otras células somáticas). En conjunto, todos estos procesos podrían contribuir a mantener el estado de quiescencia de las gónadas de los topos durante el periodo no reproductivo.

En *T. occidentalis* también analizamos los niveles de expresión de genes pertenecientes a la “firma de expresión génica” de grupos espermatogénicos tempranos y descubrimos que varios procesos biológicos están alterados en los testículos inactivos del topo ibérico, en particular la ubiquitinación de proteínas en la etapa de espermatogonia. Sin embargo, es difícil saber si esta alteración en los perfiles de expresión se debe al entorno testicular de los testículos quiescentes, en el que tanto la BTB como la función de adhesión celular están comprometidos, o a mecanismos actualmente desconocidos que afectan directamente a la expresión de las células germinales, o a ambos.

Por último, hemos comparado los datos de los transcriptomas del topo con los del topillo mediterráneo. Encontramos un gran número de genes que están desregulados en los testículos inactivos de ambas especies, con dos coincidencias notables: 1) muchos de estos genes están implicados en el control de la adhesión celular y, de acuerdo con esto, se desregulan rutas moleculares como MAPK, ERK1/2, TGF- β , GTPasa y TNF, que controlan las uniones celulares en el epitelio germinativo y 2) también encontramos un conjunto compartido de genes implicados en la regulación de la respuesta inmune. Estas coincidencias son relevantes si tenemos en cuenta que los testículos inactivos de estas dos especies no presentan características idénticas. Por ejemplo, la iniciación de la meiosis por

parte de las espermatogonias está completamente abolida en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus*, pero no en los de *T. occidentalis*, donde las células germinales entran en meiosis y la espermatogénesis progresa hasta los primeros estadios de espermatoцитos primarios. Además, los túbulos seminíferos inactivos de *M. duodecimcostatus* permanecen adyacentes entre sí, mientras que los de *T. occidentalis* se separan ampliamente por la interposición de las células de Leydig. A pesar de estas diferencias, aquí hemos encontrado que dos importantes funciones testiculares, la adhesión celular y la respuesta inmune, están desreguladas en los testículos inactivos de estas dos especies, lo que sugiere que existen mecanismos moleculares conservados asociados a la involución testicular estacional en los mamíferos. Por lo tanto, deberían realizarse estudios similares en otras especies para comprobar esta hipótesis.

1. RESUMEN

2. Abstract

Seasonal reproduction is the reproduction that occurs discontinuously throughout the year as a result of adaptation to environmental fluctuations resulting from climatic seasons. This behaviour is exhibited by numerous vertebrate species inhabiting temperate regions of the Earth, thus concentrating their reproductive effort in those seasons of the year that offer the best environmental conditions and ensuring that the offspring born and grow in the most favourable periods. Species with seasonally reproduction are able to stop and resume gametogenesis cyclically. Both males and females undergo substantial changes in their gonads during the transition between reproductive and non-reproductive periods. In males, a process of testicular regression takes place which involves major changes in testicular function, altering spermatogenesis, androgenesis and the local immune system. Most of the studies to date are incomplete due to they only focus on very particular aspects of the process in many cases (apoptosis, hormonal variations, ultrastructure, morphological changes, dynamics of cell adhesion molecules). Complete studies including all these features have only been carried out on a small number of species, such as the Iberian mole, the large hairy armadillo and the Mediterranean vole.

In the present PhD thesis, we have carried out a comprehensive study of the process of testicular regression in a new species, the long-eared hedgehog, *Hemiechinus auritus* captured from northern Egypt. Our results show that germ cell desquamation is the main effector of testicular regression in this species, as previously described in two studies in the Iberian mole *Talpa occidentalis* and the large hairy armadillo *C. villosus*. The presence of abundant primary spermatocytes in the lumen of seminiferous tubules and epididymis indicates that immature meiotic cells detach early from the seminiferous epithelium. Subsequently, these detached germ cells are eliminated via the distal section of the genito-

2. ABSTRACT

urinary tract. In addition we found that apoptosis is not the main cause of germ cell loss in the regressing testis of *H. auritus*, as very small numbers of apoptotic cells are present in these testes. However, apoptosis has an important role in the quiescent testis, because it is the main mechanism that eliminates primary spermatocytes that reach the pachytene stage. On the other hand, we have found that the expression of cell adhesion molecules is altered in both the germinal epithelium of regressing and inactive testes, suggesting that Sertoli cell-cell adhesion and Sertoli cell-germ cell adhesion is compromised in regressing testes, thus explaining the germ cell detachment that occurs during this period. Finally, as happens in all species studied to date, circulating testosterone levels are reduced in reproductively inactive *H. auritus* individuals, indicating that reduced androgen concentration is probably the hormonal signal that induces seasonal germ cell depletion and loss of cell adhesion in the mammalian germ cell epithelium.

From the different studies carried out in mammals, including the present one, it is clear that there is not a unique mechanism of testis regression. Two main cellular processes by which germ cells are massively depleted during the process of testicular regression have now been identified: apoptosis and germ cell desquamation. Despite this, the genetic control of these testicular changes is poorly understood, mainly because of the complexity of the genetic pathways operating in a specific testicular cell type and the cross-signalling between different cell types. In this sense, expression profiling studies can provide an integrated view of the interacting molecular pathways that act on the testis, and can also give us information on which of them are affected in the regressing testis. In this PhD thesis we have analysed the testicular transcriptome of two species in which we had previously carried out histological, immunohistological, functional and hormonal studies throughout their reproductive cycle: the Mediterranean vole, *Microtus duodecimcostatus*, and the Iberian vole, *T. occidentalis*.

In *M. duodecimcostatus*, we found that MAPK/ERK1/2, WNT, TGF- β , cytosolic Ca²⁺ and PI3K signalling pathways are downregulated in the inactive testis. All these pathways operate in Sertoli cells and are involved in the regulation of spermatogenesis and in the dynamics of tight and adherens junctions present in the BTB. Our analysis demonstrated

that MAPK/ERK1/2, a signalling pathway required for mitotic and meiotic cell proliferation, plays a central role in this process. Previous studies have shown that testosterone modulates the activity of the MAPK/ERK signalling pathway in Sertoli cells, indicating that decreased serum testosterone levels in inactive *M. duodecimcostatus* males affect Sertoli cell regulation of several interconnected molecular pathways leading to: a) alterations in the spermatogenic cycle, b) deregulation of cell adhesion molecules and c) alteration of BTB dynamics.

The testis is subjected to a special immunological environment, known as the *immuno-privilege*, that protects the germ cells from autoimmune response. This immuno-privilege is based on: a) the formation of BTB in the germinal epithelium, b) the decreased ability of the testicular macrophage population to induce an inflammatory response and c) the constitutive expression of anti-inflammatory cytokines by immune and somatic cells. Our transcriptomic analysis indicated that the macrophage population was activated in the inactive testis of *M. duodecimcostatus*. Previous studies have shown that testosterone is essential to maintaining testicular immuno-privilege under physiological conditions, so we can conclude that reduced testosterone levels in the inactive testis of *M. duodecimcostatus* may induce the secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages and, probably, by other somatic cell types (e.g. Sertoli and peritubular myoid cells) that activate macrophages. Interestingly, transcriptomic study of *T. occidentalis* testis also revealed that biological processes such as cell adhesion and cell junction assembly, as well as several molecular pathways, including MAPK, ERK1/2, TGF- β , cytosolic Ca²⁺, PI3K, GTPase and TNF were altered in the quiescent testis. On the other hand, transcriptomic analysis also revealed that the immune system was activated in the inactive testis of *T. occidentalis*. According to all these observations, we suggest that, as in *M. duodecimcostatus*, low testosterone levels in the inactive testis of *T. occidentalis* lead to the loss of the immuno-privilege operating in the active testis, as manifested by permeability of the BTB and increased cytokine production by the macrophage population (and perhaps other somatic cell). Definitely, all of these processes could contribute to the maintenance the quiescent state of the mole gonads during the non-reproductive period.

In *T. occidentalis* we also analysed the expression levels of genes

2. ABSTRACT

belonging to the gene expression profile of early spermatogenic clusters and found that several biological processes are altered in inactive testes, in particular the protein ubiquitination at the spermatogonia stage. However, it is difficult to know if this alteration in expression profiles is due to the testicular environment of the quiescent testis, in which both BTB and cell adhesion function are compromised, or to currently unknown mechanisms directly affecting germ cell expression, or both.

Finally, we compared the transcriptomic data of both the Iberian mole and the Mediterranean pine vole. We found a large number of genes that are deregulated in the inactive testes of both species, and found two notable coincidences: 1) many of these genes are involved in the control of cell adhesion, including those involved in molecular pathways such as MAPK, ERK1/2, TGF- β , GTPase and TNF, which control cell junctions in the germinative epithelium, and 2) we also found a shared set of genes involved in the regulation of the immune response. These overlaps are relevant because the inactive testes of these two species do not have identical features. For example, the initiation of meiosis by spermatogonia is completely abolished in the inactive testes of *M. duodecimcostatus*, but not in those of *T. occidentalis*, where spermatogonia continue enterig meiosis and spermatogenesis progresses to zygotene-pachytene. In addition, the quiescent seminiferous tubules of *M. duodecimcostatus* remain adjacent to each other, whereas those of *T. occidentalis* are widely separated by Leydig cell intervention. Despite these differences, here we have found that two important testicular functions, cell adhesion and immune response, are dysregulated in the inactive testes of these two species, suggesting that there are conserved molecular mechanisms associated with seasonal testicular involution in mammals. Therefore, similar studies should be conducted in other species to test this hypothesis.

3. Introducción

3.1 Reproducción sexual

La reproducción sexual es el proceso que genera un nuevo individuo a partir de la combinación del material genético de dos individuos de la misma especie. Representa un hecho fundamental para la supervivencia y propagación de numerosas especies. En este proceso actúan las células sexuales, los gametos masculino y femenino, cuya fusión inicia el desarrollo del nuevo individuo. Las gónadas son los órganos especializados en generar y mantener estos gametos haploides, espermatozoides en el caso de machos y óvulos en el de las hembras, y son los únicos órganos diferentes en machos y hembras, cuyo desarrollo se realiza a partir de un mismo primordio gonadal embrionario. En mamíferos, esta diferenciación gonadal marca el inicio de la diferenciación sexual, que viene determinada por la presencia en los machos del gen *SRY*, que está ligado al cromosoma Y, y su ausencia en las hembras. La expresión de *SRY* en el primordio gonadal de los machos activa una cascada génica que induce la diferenciación testicular (Sinclair *et al.*, 1990). En cambio, su ausencia en las hembras permite la activación de la ruta de señalización WNT, que da lugar a la diferenciación ovárica. En el individuo adulto, las gónadas están implicadas en la producción de gametos y en funciones endocrinas, secretando hormonas responsables del crecimiento, desarrollo, mantenimiento y regulación del sistema reproductor.

3.1.1 Estructura de los testículos y los epidídimos

El testículo es el órgano principal del aparato reproductor masculino. Una de las funciones biológicas más importantes de los testículos adultos es

3. INTRODUCCIÓN

la de mantener la fertilidad durante la vida reproductiva al mediar en la renovación y diferenciación de las células madre espermatogoniales dentro de los túbulos seminíferos, procesos fundamentales para la generación y mantenimiento de los espermatozoides. El testículo se encuentra compartimentado en dos zonas claramente diferenciadas: los túbulos seminíferos y el tejido intersticial. Los túbulos seminíferos contienen el epitelio germinativo, formado por células somáticas, las células de Sertoli, y diversos tipos de células germinales. En el epitelio germinativo tiene lugar la espermatogénesis, proceso por el cual se producen espermatozoides mediante la diferenciación de las células madre espermatogoniales. Este proceso incluye una división meiótica y se inicia en la parte exterior del túbulo seminífero, progresando hacia el lumen (Fig. 3.1). Las células de Sertoli envuelven a las células germinales actuando como soporte, aportando nutrientes y ejerciendo funciones de regulación del ciclo espermatogénico, ya que, como veremos más adelante, son células diana de las hormonas gonadotrópicas y de los andrógenos (Jégou, 1993). Además, participan en la deposición de componentes de la matriz extracelular, permitiendo la formación de uniones celulares especializadas. También son indispensables para la espermiación que es el proceso de diferenciación de los productos meióticos que da lugar a la formación de espermatozoides. Este proceso tiene tres pasos principales: 1) encapsulación de las cabezas de las espermátidas, 2) eliminación de las uniones especializadas Sertoli-espermátida y 3) la liberación final de las espermátidas. Además, las células de Sertoli forman la barrera hemato-testicular (BTB, del inglés: *blood-testis barrier*), que se establece mediante la formación de uniones estrechas entre células de Sertoli adyacentes y que divide el epitelio germinativo en dos compartimentos aislados: el compartimento basal, en el que se encuentran alojadas las espermatogonias y los espermatoцитos muy tempranos, y el compartimento adluminal, en el que se encuentran todas las demás células de la línea germinal (espermatoцитos primarios y secundarios, espermátidas y espermatozoides) (Russell y Clermont, 1977). Esta barrera aísla las células meióticas y post-meióticas del sistema inmunológico, evitando reacciones autoinmunes derivadas del hecho de que este tipo de células no existían cuando se desarrolló aquel. En la etapa inicial de la profase I de la meiosis, preleptoteno, los espermatoцитos cruzan la BTB desde el compartimento basal al adluminal, donde completarán la meiosis. Una vez situados en el

3.1. REPRODUCCIÓN SEXUAL

compartimento adluminal, se desarrollan en un ambiente protegido. Asimismo, la BTB previene el paso de sustancias citotóxicas del sistema circulatorio a las células germinales. En consecuencia, cuando la BTB pierde su funcionalidad se detiene la espermatogénesis (Wong y Cheng, 2005).

Las células de Sertoli tienen un núcleo irregular, y disponen su polo apical orientado hacia el lumen de los túbulos seminíferos y el polo basal orientado hacia el exterior. Rodeando la pared externa de los túbulos, se sitúa una capa de células denominada túnica propia, y que está formada por las células mioides peritubulares, que tienen capacidad contráctil similar a la del músculo liso y realizan movimientos peristálticos que permiten evacuar el contenido espermático del lumen tubular. Además, las células mioides participan en la regulación de la espermatogénesis y la función testicular interactuando con las células de Sertoli. Esta interacción se produce gracias a que secretan factores de crecimiento (PMOds, TGF β , IGF-I y activina-A) y componentes de la matriz extracelular (fibronectina, colágenos de tipo I y IV y proteoglicanos) que formarán la lámina basal del túbulo donde se asienta el nicho de células madre espermatogoniales (Richardson *et al.*, 1995; Skinner *et al.*, 1985). Las células mioides peritubulares también contienen receptores de andrógenos, por lo que participan en el control hormonal de la espermatogénesis e intervienen en el procesamiento del retinol.

El compartimento intersticial del testículo alberga fundamentalmente las células de Leydig. Éstas células constituyen el linaje estereoidogénico principal de la gónada ya que son las encargadas de producir y secretar los andrógenos, principalmente testosterona, que es la hormona sexual masculina más importante. Además, producen dihidrotestosterona, androstendiona y dehidroepiandrosterona. Se trata de células de morfología poliédrica con un destacado núcleo y citoplasma eosinófilo, con numerosas vesículas lipídicas. En el compartimento intersticial, es común encontrar macrófagos, frecuentemente en la superficie de los túbulos seminíferos, donde expresan factores que inducen la proliferación y diferenciación de las espermatogonias (DeFalco *et al.*, 2015). Por otro lado, en este compartimento se localizan también vasos sanguíneos, linfáticos y nervios.

En la parte posterior de los testículos, están situados los epidídimos, formados por un conducto estrecho, alargado y enrollado sobre sí mismo

3. INTRODUCCIÓN

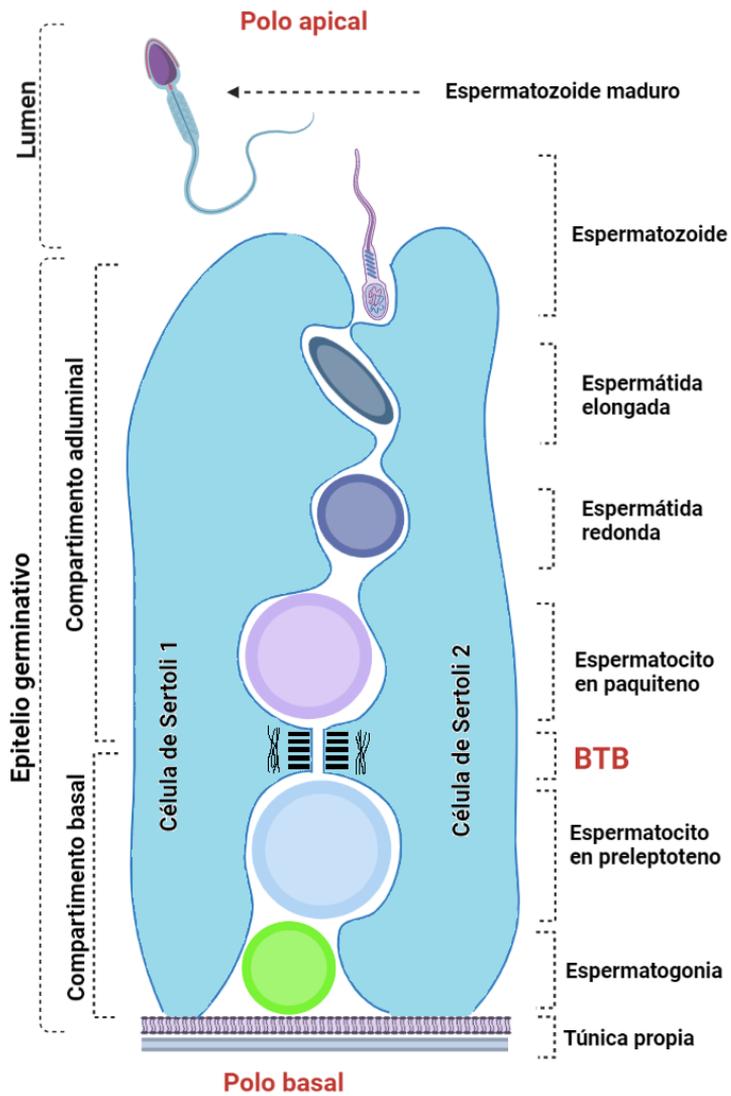


Figura 3.1: Localización de la BTB en el testículo: Dibujo esquemático en el que se ilustra la localización de la BTB y de las diferentes células espermáticas en el epitelio seminífero. Explicación en el texto (Created with BioRender.com)

que conecta los testículos con los conductos deferentes y son los responsables tanto de la capacitación como del almacenamiento de los espermatozoides. La capacitación es la última fase de la maduración de los espermatozoides, durante la cual adquieren la capacidad de unirse a la zona pelúcida del ovocito y de llevar a cabo la reacción acrosómica.

3.1.2 Espermatogenesis

El proceso de la espermatogénesis depende de la existencia de células germinales que puedan entrar en meiosis. Se trata de las espermatogonias, que se diferencian a través de múltiples divisiones mitóticas y meióticas hasta llegar espermatozoides maduros, proceso que tiene lugar en los túbulos seminíferos y se divide en tres etapas. En la primera, las células madre germinales (espermatogonia tipo A) se dividen mediante mitosis, manteniendo así el reservorio de células germinales. La mitad de las células hijas inicia la segunda etapa diferenciándose como espermatogonias tipo B que entran en meiosis convirtiéndose en espermatoцитos primarios. Estos migran al compartimiento adluminal del túbulo seminífero, atravesando la BTB y dan lugar a 4 espermátidas redondas haploides. Por último, en la tercera etapa, se lleva a cabo la espermiogénesis mediante la formación del acrosoma, la condensación del núcleo y la diferenciación del flagelo espermático. Durante este proceso la mayor parte del citoplasma es eliminado y el espermatozoide maduro es liberado al lumen del túbulo seminífero gracias a la interacción con la célula de Sertoli, proceso denominado espermiación (Bellve y O'Brien, 1983).

Eje hipotálamo-pituitaria-gónada

La función testicular no es autónoma sino que está controlada por el eje hipotálamo-pituitaria-gónada (HPG) (Fig. 3.2). Este eje está formado por un conjunto de glándulas endocrinas entre las que se incluyen el hipotálamo, la pituitaria (hipófisis anterior), y las gónadas. Todas ellas juegan un papel fundamental en el desarrollo y regulación del sistema reproductivo. Las neuronas hipotalámicas son estimuladas por factores externos, lo que finalmente produce la liberación del decapeptido GnRH

3. INTRODUCCIÓN

(hormona liberadora de gonadotropinas) al sistema de vasos porta-hipofisario e induce la síntesis de las hormonas gonadotrópicas: LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona estimulante del folículo) en la glándula pituitaria. La LH tiene como función el regular y estimular la biosíntesis de testosterona en las células de Leydig, que desempeña diversas funciones en multitud de órganos diana. La FSH, en cambio, estimula la espermatogénesis al actuar sobre las células de Sertoli mediando en el proceso de maduración de los espermatozoides (Hayes *et al.*, 2001). Las células de Sertoli, a su vez, producen otras hormonas como la inhibina, que actúa sobre la hipófisis frenando la producción de FSH, y la activina y la folistatina que, por el contrario, estimulan su secreción. La liberación de LH es un proceso discontinuo que ocurre fundamentalmente durante la noche y se corresponde con la secreción de GnRH, que está ligado al fotoperiodo, y cuyos niveles disponibles determinan la cantidad de testosterona secretada. La testosterona liberada al torrente sanguíneo por las células de Leydig tiene un efecto regulador sobre el hipotálamo y la pituitaria, inhibiendo la síntesis de hormonas en las mismas.

Sharpe *et al.* (1988) hicieron diferentes estudios con ratas a las cuales extirparon la hipófisis y mediante la inyección de dimetanosulfonato de etano (EDS), una citotoxina específica de las células de Leydig, consiguieron retirar completamente la testosterona intratesticular. Posteriormente, a un grupo de ratas tratadas les administraron FSH, a otro solo testosterona y al último las trataron con ambas. Los resultados, indicaron que la FSH induce parcialmente la espermatogénesis hasta el desarrollo de espermátidas, mientras que la testosterona es capaz de mantener el desarrollo de espermátidas durante todo el ciclo. En el grupo de ratas tratadas conjuntamente con FSH y testosterona, se observaron efectos sinérgicos sobre la espermatogénesis, ejerciendo mayor efecto que los vistos de forma individual. De esta manera, concluyeron que la FSH desarrolla funciones durante el ciclo de la espermatogénesis y que este papel es esencial para aumentar la respuesta de los testículos a la testosterona.

3.1. REPRODUCCIÓN SEXUAL

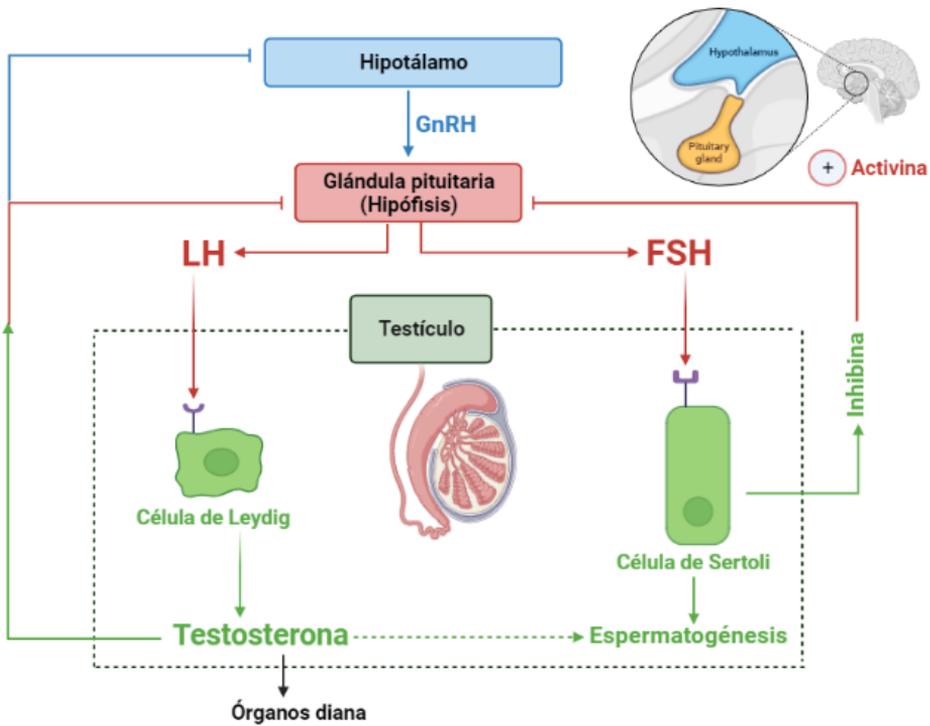


Figura 3.2: El eje hipotalámico-pituitario-gonadal: Representación esquemática de las interacciones entre las hormonas y las glándulas del eje HPG durante el control del ciclo reproductivo. Explicación en el texto (Created with BioRender.com)

3. INTRODUCCIÓN

Regulación de la espermatogénesis mediante señalización paracrina

Se sabe que las células de Sertoli establecen numerosas vías de señalización paracrina implicadas en la regulación de la espermatogénesis, por lo que el papel de éstas células en dicha regulación es muy importante (Ni *et al.*, 2019). Las vías de señalización paracrina más importantes son las siguientes:

a) **Ácido retinoico**

El ácido retinoico (RA, del inglés *retinoic acid*) es un metabolito de la vitamina A que difunde fácilmente a través de los tejidos gracias a su carácter lipídico y es necesario para la expresión del gen *Stra8*, que controla el inicio de la meiosis en células germinales de ratón (Koubova *et al.*, 2006). Su presencia es imprescindible para la espermatogénesis, ya que la deficiencia de vitamina A en la dieta de las ratas causa su detención (Morales y Griswold, 1987).

b) **MAPK**

Las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés, *mitogen-activated protein kinases*) se encuentran tanto en las células de Sertoli como en las células germinales del epitelio seminífero y son reguladores muy importantes en multitud de procesos celulares. En los testículos de mamíferos, juegan un papel imprescindible durante la espermatogénesis, regulando la autorrenovación de las células madre espermatogoniales y en la dinámica de las uniones celulares Sertoli-Sertoli y Sertoli-célula germinal dentro compartimento adluminal, ya que regulan la renovación de los complejos proteicos asociados a la unión celular. Existen varias subfamilias de MAPK, entre las que se encuentran las quinasas reguladas por la señal extracelular (ERK), las c-Jun N-terminal (JNK) y las MAPK p38 (Johnson y Lapadat, 2002; Pearson *et al.*, 2001). Las MAPK se activan por estímulos internos y externos y las subfamilias implicadas dependen de la naturaleza del estímulo, obteniendo una serie de respuestas entre las que se incluyen división celular, diferenciación, migración, expresión génica y apoptosis (Martín-Blanco, 2000; Reddy *et al.*, 2003; Dent *et al.*, 2003; Kyriakis y

[Avruch, 2001](#)). La subfamilia ERK ejerce funciones en la modulación de la adhesión celular y la motilidad en diferentes epitelios.

c) WNT

Las WNT son glicoproteínas ricas en cisteína que controlan un gran número de procesos durante el desarrollo embrionario además de la polaridad celular y la adhesión mediada por caderinas. La desregulación de la señal WNT conduce a la formación de tumores, ya que a nivel celular, dicha señal regula la morfología, proliferación, motilidad y destino celular, que son procesos importantes en la espermatogénesis ([Cadigan y Nusse, 1997](#)).

d) TGF- β

TGF- β es una citoquina implicada en procesos celulares, cuya expresión es variable entre especies. En ratas se expresa en las células de Leydig, Sertoli, espermatoцитos y espermátidas ([Olaso *et al.*, 1998](#); [Haagmans *et al.*, 2003](#)). TGF- β se une a los receptores transmembrana de la superficie celular ([Wrana *et al.*, 1994](#)), ejerciendo una regulación en un gran número de funciones celulares tales como la hematopoyesis, angiogénesis, diferenciación, migración, proliferación y apoptosis ([Gonzalo-Gil y Galindo-Izquierdo, 2014](#); [Ohta *et al.*, 1996](#)).

e) AMPK

La AMPK es un tipo de quinasa que actúa como sensor de energía, ya que es sensible al aumento de la relación AMP:ATP intracelular ([Crisóstomo *et al.*, 2018](#); [Galardo *et al.*, 2007](#)). La vía de señalización de la AMPK en las células de Sertoli regula el metabolismo energético, la estabilidad del complejo de unión intercelular y la proliferación ([Petricca *et al.*, 2019](#)). Una vez que el equilibrio se interrumpe se altera el microambiente testicular, afectando a la calidad de los espermatozoides, con cambios en la morfología de la cabeza espermática, la vaina y la motilidad ([Tartarin *et al.*, 2012](#)). Además, se ha comprobado que los ratones mutantes condicionales para la $\alpha 1$ AMPK tienen una expresión reducida de proteínas de unión (β -catenina, vimentina, ocludina y ZO-1), y una desregulación de la homeostasis energética ([Bertoldo *et al.*, 2016](#)). Esto apoya la noción de que la vía de señalización de la

3. INTRODUCCIÓN

AMPK en las células de Sertoli tiene un papel importante en la espermatogénesis. La regulación del metabolismo energético se lleva a cabo mediante el control de la producción de lactato. Las células de Sertoli producen lactato y piruvato a partir de glucosa y los suministran a las células germinales (Kishimoto *et al.*, 2015; Brauchi *et al.*, 2005). Durante este proceso, los transportadores de glucosa regulan la glucólisis a través del transporte transmembrana del sustrato, mientras que los transportadores de monocarboxilato controlan el suministro de lactato a las células germinales y ambos transportadores contribuyen a ajustar la producción de lactato en las células de Sertoli (Rato *et al.*, 2012; Nakai *et al.*, 2006). Por tanto la vía de señalización de AMPK en células de Sertoli sirve como regulador para proporcionar lactato, que aporta energía a las células germinales y mantiene la espermatogénesis (Galarido *et al.*, 2010). En el compartimento adluminal, el lactato, junto con la glucosa y la acción de la LH (ver más adelante) modulan la concentración de Ca^{2+} y el pH intracelular en espermátidas y espermatoцитos primarios (Reyes *et al.*, 2002; Costa y Varanda, 2007). El Ca^{2+} intracelular participa en el transporte de colesterol desde el citoplasma a las mitocondrias. Una mayor concentración de Ca^{2+} aumenta el nivel de transporte y esto, a su vez, incrementa la producción de testosterona en las células de Leydig (Spät *et al.*, 2001).

3.1.3 Uniones inter-celulares en el testículo

En la cara externa de los túbulos se sitúan las células mioides peritubulares, que forman una única capa de células en el caso de los roedores, denominada túnica propia (Fig. 3.3). Estas células mioides están unidas por complejos de unión que contienen numerosos filamentos de actina que se distribuyen orientados de forma paralela y perpendicular al eje longitudinal del túbulo seminífero (Maekawa *et al.*, 1996). Además, contienen otras proteínas citoesqueléticas como miosina, desmina/vimentina y actinina-A. Al tratarse de células con capacidad contráctil, desempeñan funciones de transporte de fluidos testiculares y espermatozoides en el túbulo. Las células de Sertoli, en cambio, residen en la membrana basal de los túbulos seminíferos, dando soporte a las células germinales durante todo el proceso de la espermatogénesis. La BTB se desarrolla en ratas y ratones entre 17

3.1. REPRODUCCIÓN SEXUAL

y 20 días post parto y está formada por diferentes tipos de uniones (Fig. 3.3) (Dym y Fawcett, 1970; Pelletier y Byers, 1992). Entre estas están 1) los desmosomas, que establecen uniones puntuales entre células adyacentes mediante cadherinas, 2) las uniones adherentes, formadas principalmente por cadherinas y cateninas que sirven de anclaje entre células contiguas, 3) las uniones de tipo *gap*, que presentan conexinas en su estructura y conectan las membranas plasmáticas a través de canales situados entre citoplasmas de células adyacentes, y 4) las uniones estrechas, destacando en ellas la presencia de claudinas y ocludinas que impiden el flujo libre de sustancias y moléculas de adhesión JAM, que se unirá a la actina a través de la *zonula occludens* (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) (Stanton, 2016). Las células de Sertoli facilitan la migración de las células germinales en desarrollo desde el compartimento basal al adluminal. Para que se produzca este desplazamiento es preciso que las uniones estrechas de la BTB se rompan, así como las uniones entre las células de Sertoli y las germinales, para volver a restablecerse tras dicha migración. Sin embargo, las células madre espermatogoniales nunca migran al compartimento adluminal, permaneciendo unidas a la membrana basal. Por su parte, el epitelio que rodea el epidídimo está formado por uniones estrechas y adherentes que conectan las células de la región apical para formar la barrera hemato-epididimaria (BEB, del inglés *blood-epididymis barrier*) (Gregory y Cyr, 2006; Hoffer y Hinton, 1984).

A modo esquemático, las principales proteínas de unión celular que encontramos en el testículo son las siguientes:

- *Claudina 11*: son proteínas que forman las uniones estrechas existentes entre células de Sertoli contiguas.
- *Conexina*: familia de proteínas estructurales transmembrana que se unen para formar uniones *gap* esenciales en numerosos procesos fisiológicos.
- *Laminina*: se trata de un grupo de glucoproteínas que dan lugar a la lámina basal y que se presentan asociadas a otras proteínas, teniendo funciones de anclaje celular.
- *β catenina*: se trata de un miembro de la familia de las cateninas existente tanto en el citoplasma como núcleo celular y que participa

3. INTRODUCCIÓN

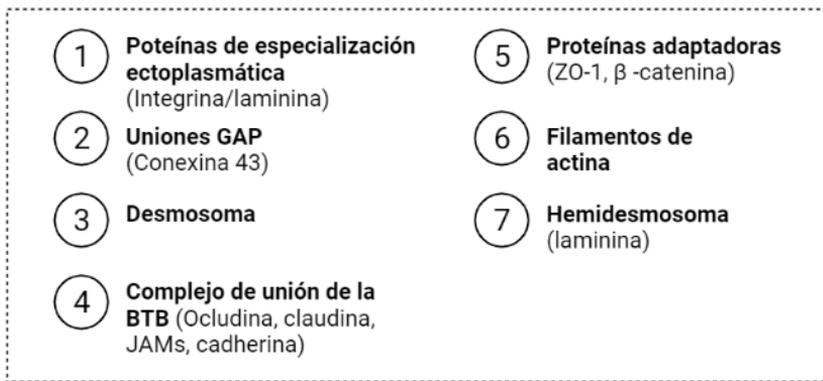
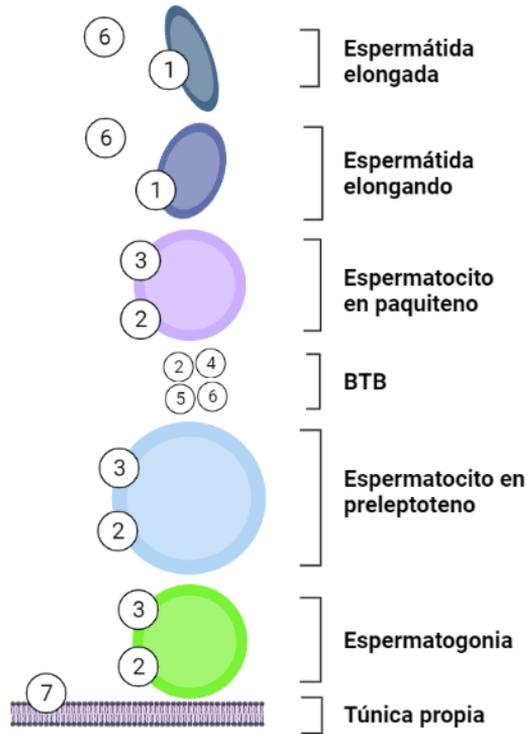


Figura 3.3: Uniones celulares: Dibujo esquemático que ilustra la ubicación de los diferentes tipos de uniones celulares en el epitelio seminífero de mamíferos adultos (Cheng y Mruk, 2012). Explicación en el texto (Created with BioRender.com)

en la formación de uniones adherentes ayudando a anclar las cadherinas al citoesqueleto de actina.

- *N-cadherina*: es un tipo de cadherina responsable de las uniones célula-célula para mantener la integridad de los tejidos. Estas glucoproteínas transmembrana son las principales moléculas de adhesión celular con un papel importante en diferentes procesos fisiológicos
- α *Actinina*: la alfa actinina es una proteína de unión a actina especialmente abundante en los sarcómeros del músculo esquelético. Esta proteína interviene junto con las cateninas y las cadherinas en la comunicación entre el exterior celular, con las estructuras de adhesión celular y el citoesqueleto.

Para más información, ver [Pelletier \(2011\)](#)

3.1.4 Privilegio inmunológico testicular

La existencia en el testículo adulto de espermatozoides y demás células germinales meióticas y post-meióticas implica un desafío para el sistema inmunológico, ya que se trata de células propias del organismo que, sin embargo, aparecen mucho después de la maduración del sistema inmunológico y la formación de la auto-tolerancia inmunológica. El término *privilegio inmunológico* (o *inmuno-privilegio*) se refiere a la supervivencia de este tipo de células que expresan antígenos que, en circunstancias normales, deberían provocar una respuesta auto-inmune. Ésta es una adaptación evolutiva para proteger tejidos vulnerables y evitar la pérdida de su función ([Maddocks y Setchell, 1990](#); [Setchell et al., 1990](#)). Tanto las células germinales situadas en los testículos como los espermatozoides en el epidídimo, están protegidos de las células inmunes mediante barreras específicas. La BTB ([Cheng y Mruk, 2012](#)) y la BEB ([Cyr et al., 2007](#)) crean un microambiente esencial para la espermatogénesis, maduración y almacenamiento en el interior de estos tejidos. Ambas barreras limitan la entrada de leucocitos y anticuerpos al compartimento adluminal y previenen el contacto de inmunoglobulinas de

3. INTRODUCCIÓN

la sangre con los antígenos presentes en las células germinales (Mital *et al.*, 2011).

En un primer momento, se atribuyó este privilegio del testículo a la existencia de la BTB como único medio para proteger a las células germinales, pero se ha demostrado que es un sistema complejo, con una combinación equilibrada entre elementos físicos de barrera y el control endocrino y paracrino de las células inmunitarias y somáticas. Los mecanismos responsables aún no se conocen con exactitud, pero parece ser fruto de una cooperación entre: 1) las uniones celulares en el testículo y epidídimo (BTB y BEB), 2) las células inmunológicas del intersticio (macrófagos, células dendríticas y linfocitos) y 3) las células somáticas testiculares (células de Leydig, Sertoli y células mioideas peritubulares). Una característica del sistema inmune presente en el testículo es la inactivación de las células T específicas de antígeno. La actividad de los linfocitos T está controlada por un proceso de apoptosis que se induce por la interacción del receptor Fas (CD95), presente en la superficie de los linfocitos, con su ligando (FasL) (Ju *et al.*, 1995). Existen pruebas de que la expresión de FasL en las células epiteliales de los tejidos inmuno-privilegiados, entre las que se incluye las células de Sertoli, puede ser responsable de la eliminación de las células T activadas, suprimiendo así la inmunidad de manera localizada (Bellgrau *et al.*, 1995). Además, las células de Sertoli expresan el ligando B7-H1, que induce la apoptosis de los linfocitos T (Dal Secco *et al.*, 2008), así como inhibidores del complemento, que son un importante inductor de la inflamación y la posterior respuesta inmune. Otro colaborador en la supresión de los linfocitos T es la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) cuya inhibición anula la capacidad de las células de Sertoli para proteger los aloinjertos de islotes pancreáticos (Fallarino *et al.*, 2009). La proteína IDO causa inmunosupresión a través del metabolismo del triptófano, ya que el agotamiento del triptófano hace que los linfocitos T se inactiven. Además, se ha encontrado que la mayoría de los macrófagos testiculares que residen dentro de los testículos exhiben un fenotipo caracterizado por una producción reducida de citocinas proinflamatorias y un aumento de las funciones inmunorreguladoras (Hedger, 2002; Kern *et al.*, 1995). Éstos macrófagos ejercen funciones en la proliferación y diferenciación de las espermatogonias, siendo las células de Leydig las encargadas de regular su

acción a través del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (Wang *et al.*, 1994; Meinhardt *et al.*, 1998). Varios estudios indican que la expansión de la población de macrófagos y su mantenimiento está bajo el control de la LH, y que la FSH está implicada en su maduración (Raburn *et al.*, 1993; Duckett *et al.*, 1997).

Por otro lado, las células de Leydig contribuyen a la función inmunológica testicular regulando el número de leucocitos testiculares e influyendo en el entorno inmunológico de los testículos mediante la secreción de citocinas y andrógenos. Éstos últimos regulan la actividad de las células inmunitarias dentro de los testículos y los ganglios linfáticos, alterando los flujos de Ca^{+2} en los linfocitos y macrófagos a través de los receptores acoplados a la proteína G de la membrana (Benten *et al.*, 1999; Wunderlich *et al.*, 2002). La función de células mioides peritubulares en las respuestas inflamatorias y el mantenimiento del privilegio inmunológico no se conoce bien, aunque se sabe que secretan sustancias receptoras y mediadoras en procesos inflamatorios (Iosub *et al.*, 2006; Schuppe y Meinhardt, 2005; Schell *et al.*, 2008).

Por último, cabe mencionar otros dos grupos de moléculas con efectos sobre la respuesta inmunitaria testicular: se trata de los neuropéptidos bioactivos y los prostanoides. Los péptidos derivados del gen de la pro-opiomelanocortina, la β -endorfina y la α -hormona estimulante de melanocitos, son producidos por las células de Leydig y los macrófagos testiculares, y ejercen efectos tanto estimulantes como inhibidores sobre la actividad de los linfocitos y los macrófagos (Bhardwaj *et al.*, 1996; Grabbe *et al.*, 1996). En el caso de los prostanoides, se expresan de forma constitutiva en la mayoría de las células testiculares (Winnall *et al.*, 2007), donde las prostaglandinas y el tromboxano A, en particular, tienen importantes funciones inmunosupresoras (Hata y Breyer, 2004).

3.2 Reproducción estacional

La reproducción estacional es la que se produce de forma discontinua a lo largo del año como resultado de la adaptación a las fluctuaciones ambientales resultante de las estaciones climáticas. Este comportamiento lo presentan numerosas especies de vertebrados que habitan en regiones

3. INTRODUCCIÓN

templadas de la Tierra, concentrando así su esfuerzo reproductivo en aquellas estaciones del año que ofrecen mejores condiciones ambientales y garantizando que la descendencia nazca y crezca en los periodos más favorables. En especies con reproducción continua, cuando un individuo ha alcanzado la madurez sexual, las gónadas están plenamente desarrolladas y son capaces de producir gametos de forma ininterrumpida. Pero esta gametogénesis no tiene lugar en todos los mamíferos de forma continua ya que las especies con reproducción estacional son capaces de detener y reanudar la gametogénesis de forma cíclica. En este caso, tanto los machos como las hembras experimentan cambios sustanciales en sus gónadas durante la transición entre los períodos reproductivo y no reproductivo (Bronson, 1985). En los machos tiene lugar un proceso de regresión testicular que implica cambios importantes en la función testicular, viéndose alteradas la espermatogénesis, la androgénesis y el sistema inmunológico local. Por otro lado, en las hembras los ovarios entran en una fase de anestro (fase de inactividad ovárica) acompañada de una disminución o desaparición de la receptividad sexual.

Durante la regresión testicular, la gónada masculina experimenta una reducción del epitelio germinativo que causa una disminución de la masa y el volumen gonadal, debido a que se reduce el diámetro de los túbulos seminíferos y desciende el número de células germinales. Este fenómeno implica cambios drásticos en la arquitectura y la función testicular, incluyendo la alteración de estructuras como la BTB, procesos celulares como la apoptosis y la proliferación y funciones como la producción de andrógenos. Estos cambios conducen a la interrupción de la espermatogénesis y dan paso a un periodo no reproductivo cuya duración depende de la especie y/o de la localización geográfica de la población. En algunas especies, la actividad meiótica no desaparece por completo durante este periodo, ya que las espermatogonias continúan entrando en meiosis y los espermatocitos primarios tempranos siguen estando presentes en los túbulos seminíferos de los testículos de los machos sexualmente inactivos. No obstante, estos espermatocitos primarios entran en apoptosis, interrumpiéndose así la meiosis y, en consecuencia, la espermatogénesis (Dadhich *et al.*, 2010, 2013). Esto se ha observado en una varias de especies entre las que se incluyen: hámsters (*Phodopus sungorus* y *Mesocricetus auratus*) (Furuta *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 2005),

3.2. REPRODUCCIÓN ESTACIONAL

la ardilla terrestre de Dauria (*Citellus dauricus*) (Sheng *et al.*, 2008), el armadillo de la Patagonia (*Zaedyus pichiy*) (Superina y Jahn, 2009), el mapache boreal (*Procyon lotor*) (Kaneko *et al.*, 2005), monos (*Macaca mulatta* y *M. radiata*) (Bansode *et al.*, 2003), ratones, *Apodemus speciosus* (Kuwahara *et al.*, 2000) y *Apodemus sylvaticus* (Massoud *et al.*, 2021), el caballo (*Equus caballus*) (Johnson, 1991) y topos (*Talpa europaea* y *T. occidentalis*) (Dadhich *et al.*, 2010).

Por el contrario, en otras especies con reproducción estacional, la meiosis se detiene por completo durante el periodo de inactividad sexual, por lo que los túbulos seminíferos sólo contienen células de Sertoli y espermatogonias. Esto ocurre en animales como el corzo (*Capreolus capreolus*) (Blottner *et al.*, 1996; Schön *et al.*, 2004), el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) (Andersen Berg *et al.*, 2001), el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) (Young *et al.*, 1999) y el armadillo peludo *Chaetophractus villosus* (Luaces *et al.*, 2014, 2013).

La pérdida de la mayor parte del epitelio germinativo implica una reducción drástica del diámetro de los túbulos seminíferos, lo que obliga a las células de Sertoli a reducir su volumen citoplasmático y situarse en la periferia tubular. La estructura de las células de Leydig también cambia a lo largo del ciclo reproductivo en animales con reproducción estacional. Se ha descrito una reducción en el tamaño de las células de Leydig en el damán de El Cabo, el camello, la vizcacha y el hámster durante el periodo no reproductivo (Neaves, 1973; Sinha Hikim *et al.*, 1988; Zayed *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1997). Otros mamíferos, como el hamster y el camello, muestran reducciones en el número de células de Leydig en este periodo (Johnson, 1986; Johnson *et al.*, 1987; Sinha Hikim *et al.*, 1988; Zayed *et al.*, 1995). Es posible que esta disminución en el número de células de Leydig sea debida a la apoptosis durante la regresión testicular. Pero esto no ocurre así en todas las especies: en el topo europeo, *Talpa europaea*, no se observó diferencia en el tamaño y abundancia de células de Leydig y el contenido de su citoplasma entre machos activos e inactivos (Suzuki y Racey, 1978; Tähkä *et al.*, 1989).

Las señales ambientales que determinan el ciclo de reproducción estacional son muy variadas e incluyen el fotoperiodo, la disponibilidad de alimento, el estrés, la temperatura y las precipitaciones, entre otras. Hay evidencias que muestran que el fotoperiodo es el factor ambiental

3. INTRODUCCIÓN

más importante en la regulación de la reproducción estacional (Dardente *et al.*, 2016). Esto podría deberse a que los equinoccios y solsticios son los eventos que ocurren con una mayor exactitud temporal cada año, mientras que factores tales como la disponibilidad de alimentos o la pluviometría son factores mucho más variables e impredecibles (Nakane y Yoshimura, 2019). Sin embargo, hay especies en las que el fotoperiodo no es un factor determinante en el control del ritmo de la reproducción estacional. En estas especies, factores tales como la disponibilidad de alimentos y agua, el estrés y el clima, pueden modificar e incluso superar la influencia del fotoperiodo. Por ejemplo, las hembras de musaraña doméstica asiática, *Suncus murinus*, dejan de reproducirse como consecuencia de la pérdida de la receptividad sexual en periodos de déficit nutricional (Temple, 2004). En el ratón californiano, *Peromyscus californicus*, el periodo reproductivo depende de la disponibilidad de agua (Nelson *et al.*, 1995), y en algunos rumiantes, como las ovejas, *Ovis aries*, depende de la disponibilidad de alimento y factores sociales (Martin *et al.*, 1994). Estos animales tienen un ciclo reproductivo puramente oportunista, independiente del fotoperiodo, con una estrategia reproductiva que depende de respuestas a señales ambientales en el corto plazo. Por otra parte, se ha observado, que el patrón de reproducción estacional de diferentes poblaciones de la misma especie también puede variar con la latitud. Jiménez *et al.* (1990) demostraron que los topos que habitan en el sur de la Península Ibérica se reproducen en invierno, mientras que los del centro de Europa y Gran Bretaña lo hacen en primavera y verano.

Una situación similar ocurre en machos de la musaraña común, *Crocidura russula*. En las poblaciones que habitan en el norte de la Península Ibérica se reproducen en verano y experimentan una regresión testicular completa en invierno (Fuster, 1985), mientras que en el sur el ciclo se invierte, reproduciéndose en invierno, primavera y otoño, pero no en verano. A pesar de ello, no se produce una regresión testicular estival, un hecho que los autores interpretan como una adaptación a las circunstancias particulares de estas poblaciones: 1) el periodo no reproductivo es muy corto, 2) los testículos de esta especie son pequeños como consecuencia de la monogamia y 3) su ciclo espermatogénico es largo. Como consecuencia, la regresión testicular estacional en este caso no sería rentable en términos de ahorro energético puesto que la suma de

3.2. REPRODUCCIÓN ESTACIONAL

la regresión más la recuperación de la función testicular duraría más que el periodo en que las hembras no son receptivas (Massoud *et al.*, 2014). Los autores sugieren que la sequía extrema existente durante el verano en el sureste de España es el factor que probablemente provoque este ciclo inverso, ya que, en esta región, el invierno proporciona condiciones más favorables para la reproducción. Estos hechos llevaron a Jiménez *et al.* (2015) a concluir que un determinado patrón de reproducción estacional es atribuible a poblaciones concretas de una determinada especie, pero no a la especie en sí. Además, algunos vertebrados tienen una estrategia de reproducción oportunista que implica que la reproducción tiene lugar siempre y cuando las condiciones ambientales sean favorables, independientemente del fotoperiodo, latitud o altitud, como se muestra en muchas especies de roedores (Heldstab, 2021).

3.2.1 Control de la reproducción estacional

En especies con reproducción estacional, la regulación de la función gonadal debe ser muy precisa. Entre los cambios estacionales que tienen lugar en las gónadas de estas especies, los más importantes son los que afectan a la espermatogénesis, la barrera hemato-testicular y los niveles de testosterona, mostrando todos ellos acusadas variaciones entre los dos periodos reproductivo y no reproductivo. Existen diversos estímulos externos capaces de desencadenar estos cambios estacionales aunque, como veremos a continuación ninguno de ellos está generalizado para todas las especies con reproducción estacional.

Regulación mediante el fotoperiodo

Muchos animales con reproducción estacional utilizan el fotoperiodo para regular la actividad gonadal, aunque también se ha comprobado que la respuesta al fotoperiodo es específica de cada especie. Un ejemplo de ello es la duración variable en cuanto a la gestación en muchos animales. Por ejemplo, el hámster tiene una gestación corta, de tan sólo 3 semanas, y se reproduce en primavera-verano cuando los días son más largos. Por tanto, se dice que son reproductores de día largo (Hikim *et al.*, 1988). En esta especie, los días cortos inducen una restricción de la reproducción

3. INTRODUCCIÓN

manifestada por una disminución de los niveles séricos de LH, FSH y prolactina, lo que implica una supresión completa de la espermatogénesis y una reducción de la biosíntesis de hormonas esteroideas gonadales. En cambio, las ovejas, las cabras y los ciervos tienen una gestación más larga, de 5-6 meses, y se aparean en otoño, cuando la duración del día es más corta, por lo que se consideran reproductores de día corto. Los animales que tienen periodos de hibernación, como osos, erizos, tejones, ardillas o marmotas, son reproductores de día largo, con una temporada de cría que se extiende desde finales de la primavera hasta principios o finales de verano. En estas especies, un aumento de la duración del día no sólo activa la función testicular, sino que también proporciona la señal que conduce al final del periodo de hibernación (Fowler, 1988; Tsubota *et al.*, 1997). Independientemente del periodo del año en que se produzcan las cópulas (en función de la extensión de la gestación) la mayoría de estas especies crían su descendencia en primavera-verano, cuando las condiciones ambientales son más favorables.

En mamíferos, es el sistema fotoneuroendocrino el encargado de detectar variaciones en el fotoperiodo. Éste sistema, está compuesto por la retina, la glándula pineal y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Pévet, 1988; Goldman, 2001; Schwartz *et al.*, 2001) (Fig. 3.4). La glándula pineal se encarga de transducir la duración del ciclo diario (captado por la retina) en una señal endocrina, mediante una secreción rítmica de melatonina (Simonneaux y Ribelayga, 2003). La melatonina es una hormona sintetizada a partir del triptófano, que ejerce un efecto inhibitorio sobre el sistema reproductivo (viviD y Bentley, 2018). Las concentraciones de melatonina en la glándula pineal y en sangre son bajas durante el día y aumentan durante la noche, por lo que la liberación de melatonina fluctúa con el fotoperiodo. La duración de su secreción nocturna es un factor crítico que determina respuestas fisiológicas y comportamientos reproductivos (Bartness *et al.*, 1993; Pitrosky y Pévet, 1997). A su vez, la melatonina regula la secreción de la hormona inhibidora de gonadotropina (GnIH), que inhibe la actividad de la GnRH. Esta modulación de la secreción de GnRH a través de la melatonina se puede llevar a cabo a través de dos mecanismos complementarios: 1) mediante cambios en la retroalimentación negativa de la testosterona sobre la liberación de GnRH (Tamarkin *et al.*, 1976; Barrell *et al.*, 1992) y 2) mediante una modulación

3.2. REPRODUCCIÓN ESTACIONAL

directa de la secreción de GnRH independiente de esteroides (Bittman y Goldman, 1979; Goodman *et al.*, 1982). Además, la secreción de la GnIH y su ritmo son modulados por glucocorticoides, que son secretados en situaciones de estrés y que aumentan la secreción de GnIH y, por tanto, inhiben la de GnRH (lo que a su vez inhibe la producción de gonadotropinas). La GnRH, y en general el eje HPG, es activado por las kisspeptinas, un conjunto de péptidos neuroactivos liberados por las neuronas del hipotálamo. Éstos neuropéptidos, son codificados por el gen KISS-I que se expresa también en gónadas y varios tejidos endocrinos, y participan en la regulación de la función endocrina, con la activación del receptor de kisspeptina (GPR54) que desencadena la secreción de GnRH (Revel *et al.*, 2007; Plant *et al.*, 2006). En el ejemplo del hámster, la melatonina regula la expresión de KiSS-1 en las células hipotalámicas responsables de la producción de GnRH, controlando así la reproducción.

Como idea general, las señales ambientales actúan modulando la expresión de las hormonas liberadas por el eje HPG. Los niveles de gonadotropinas séricas son más bajos en el periodo no reproductivo, hecho que en machos conduce a una reducción de la testosterona circulante, lo que se asocia a la inhibición de la espermatogénesis y, como consecuencia, a la pérdida del epitelio germinativo y la consiguiente regresión testicular, donde se reduce el tamaño y la masa testicular (Jiménez *et al.*, 2015).

Se ha comprobado que los cambios temporales del tamaño testicular no se correlacionan con alteraciones en la secreción de gonadotropinas y, por tanto, no parecen ser una consecuencia directa de las variaciones en la LH testicular. Estos resultados indican que deben existir otros mecanismos independientes de la GnRH que controlen la actividad testicular (Martin *et al.*, 1994). Uno de estos mecanismos fue descubierto en la musaraña común asiática, *Suncus murinus*, una especie en la que, como ya se indicó anteriormente, las hembras dejan de reproducirse como respuesta a la falta de alimento, mediante la pérdida completa de la receptividad sexual, una respuesta que está controlada por la GnRH-II. Por tanto, esta proteína también puede modular el comportamiento reproductivo (Temple *et al.*, 2003).

3. INTRODUCCIÓN

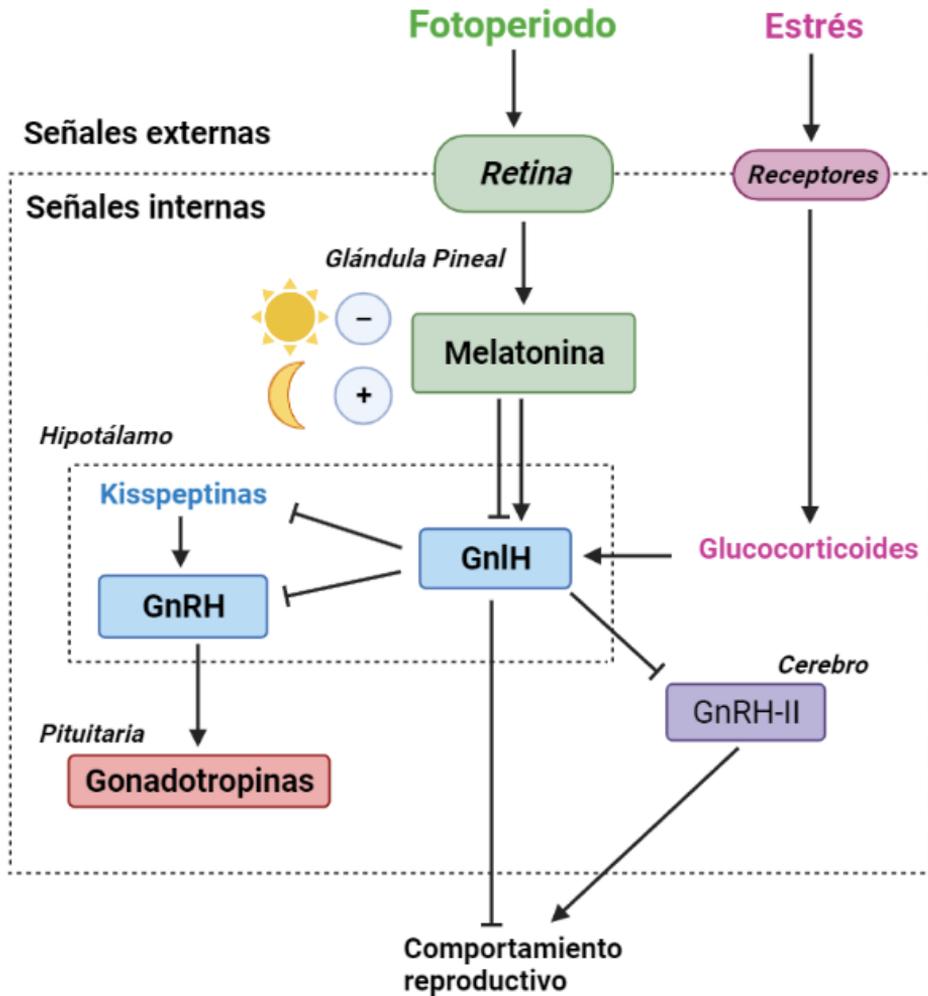


Figura 3.4: Efectos del fotoperiodo en la reproducción estacional: Representación esquemática en la que se muestra los efectos del fotoperiodo y el estrés, además de las interacciones entre moléculas durante el control del ciclo reproductivo. Explicación en el texto (Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com))

Regulación mediante andrógenos

La testosterona es la hormona esteroidea derivada del colesterol más relevante en machos y se sintetiza principalmente en las células de Leydig, un proceso regulado por el eje HPG, como hemos visto anteriormente. Pero, a su vez, los niveles de testosterona sérica son fundamentales para la regulación del propio eje HPG, por lo que la presencia de testosterona inhibe la producción de GnRH en el hipotálamo y por tanto la liberación de gonadotropinas en la hipófisis, actuando como un sistema de retroalimentación negativa. Como es de esperar, también ocurre a la inversa: ante una concentración baja de testosterona, el hipotálamo aumenta la secreción de GnRH y ésta estimula la liberación de FSH y LH, aumentando la síntesis de testosterona.

Ésta hormona tiene funciones esenciales en los machos, actuando como molécula de señalización que ejerce su efecto al unirse al receptor de andrógenos (AR, del inglés *androgen receptor*). En los testículos, AR se expresa en las células mioides peritubulares, en las células de Leydig y en las células de Sertoli, siendo todas ellas células diana para la testosterona (Sar *et al.*, 1990). Tras la unión del ligando al AR, se desencadena una cascada de moléculas de señalización que se unen a los elementos de respuesta androgénica (AREs) presentes en los promotores y/o potenciadores de determinados genes. De este modo, se regula la transcripción de estos genes en concierto con otras proteínas nucleares que sirven de coactivadores o correpresores (Shang *et al.*, 2002). En experimentos con ratones mutantes (*knockout*) que carecen de AR en todos los tejidos (ratones ARKO), la espermatogénesis se interrumpe durante la meiosis y son pocas las células germinales que maduran hasta estadios más avanzados que el de espermatozoides (Yeh *et al.*, 2002). Sin embargo, en ratones mutantes en los que el AR se eliminó selectivamente en las células de Sertoli (ratones ScARKO), la espermatogénesis rara vez progresaba más allá del estadio de espermatozoides en diplotene (De Gendt *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2006).

Las células de Sertoli son el principal transductor de señales de la testosterona y son necesarias para el mantenimiento de las células germinales y la espermatogénesis. En estas células, la testosterona puede actuar a través de dos vías que difieren del mecanismo clásico por lo que

3. INTRODUCCIÓN

otras hormonas ejercen sus efectos. En primer lugar, la estimulación de la testosterona despolariza las células de Sertoli y provoca la entrada de calcio en ellas. En segundo lugar, la testosterona activa una serie de quinasas que resultan en la activación de la vía MAPK y la fosforilación del factor de transcripción CREB (Walker y Cheng, 2005). Sharpe *et al.* (1988), en sus experimentos con ratas carentes de testosterona intratesticular, comprobaron que tras la administración de EDS no se producía la espermatogénesis. Sin embargo, el tratamiento posterior con EDS y testosterona rescató parcialmente la estructura testicular normal.

La testosterona regula la espermatogénesis a través de dos mecanismos principales: 1) regulando su propio nivel de expresión en el bucle de retroalimentación que se forma con las gonadotropinas en el eje HPG, y 2) a través de las vías de señalización de las células de Sertoli, en el que influyen tanto el nivel de testosterona como el de FSH. (Zhang *et al.*, 2003; Spaliviero *et al.*, 2004; Lindsey y Wilkinson, 1996; Johnston *et al.*, 2004). Durante el periodo no reproductivo, los niveles bajos de testosterona sérica reprimen la señalización en las células de Sertoli lo que lleva a la detención de la espermatogénesis, situación que revertirá en la siguiente temporada de cría tras darse las señales ambientales oportunas. Éste evento se ha comprobado en animales como el corzo, (*Capreolus capreolus*) (Blottner *et al.*, 1996), los monos rhesus (Conaway y D S, 1965), el ratón de bosque japonés, (*Apodemus speciosus*) (Kuwahara *et al.*, 2000), el topillo de playa, (*Microtus breweri*) (Adams *et al.*, 1980), el caballo (*Equus ferus caballus*) (Johnson, 1985), el lémur, (*Microcebus murinus*) (Petter-Rousseaux y Picon, 1981), el erizo (*Erinaceus europaeus*) (el Omari *et al.*, 1989) y el topo ibérico, (*T. occidentalis*) (Dadhich *et al.*, 2013).

Las células de Leydig de los reproductores estacionales también muestran diferencias entre los periodos reproductivo y no reproductivo. Durante el primero, los machos alcanzan la máxima producción de testosterona y, en consecuencia, la maquinaria para sintetizar hormonas esteroideas es muy activa en las células de Leydig: su citoplasma contiene un destacado retículo endoplásmico liso (SER, del inglés *smooth endoplasmic reticulum*), complejos de Golgi bien desarrollados, grandes mitocondrias y numerosas gotas lipídicas. En cambio, durante el segundo, la estructura del SER se reduce, el aparato de Golgi está poco desarrollado y el número de inclusiones lipídicas disminuye (Neaves, 1978; Johnson *et al.*, 1987; Hikim *et al.*,

1988; Zayed *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1997; Beltrán-Frutos *et al.*, 2016).

Mantenimiento de la BTB

Una de las estructuras que se ve alterada en los testículos en regresión es la BTB, que se vuelve permeable durante el periodo no reproductivo, aunque dicha permeabilización es reversible. Este proceso también está sujeto a control hormonal, aunque existe controversia sobre si el control lo ejercen la FSH, la testosterona o ambas simultáneamente (Xia *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2005, 2011; Kaitu'u-Lino *et al.*, 2007; Tarulli *et al.*, 2008). Junto a las uniones estrechas existentes entre las células de Sertoli existen multitud de haces de microfilamentos de actina que sirven como sitio de unión para las proteínas de adhesión. Éstas uniones son reguladas por una compleja red de cascadas de señalización paracrina que generan cambios en la funcionalidad de la BTB (Wen *et al.*, 2016). Además, junto a los microfilamentos de actina, encontramos microtúbulos orientados en paralelo al eje longitudinal de la célula, con funciones en el mantenimiento de la forma columnar de las células de Sertoli y en el transporte y posicionamiento de los orgánulos en el citoplasma, además de ser la maquinaria de transporte para el traslado de las espermátidas hacia el lumen tubular. (Tang *et al.*, 2016; Lie *et al.*, 2010; O'Donnell y O'Bryan, 2014; Tang *et al.*, 2013).

Existen diferentes vías de transducción de señales que están implicadas en la regulación de las uniones estrechas entre células de Sertoli, entre las que se incluyen: kinasas y fosfatasa (Balda *et al.*, 1993; Citi, 1992; Li *et al.*, 2001, 2000), Ca^2 intracelular (Nigam *et al.*, 1992; Stuart *et al.*, 1996, 1994), proteínas G, calmodulinas, cAMP, fosfolipasa C (Balda *et al.*, 1991), varios miembros de la superfamilia $\text{TGF}\beta$ y GDF9 (Lie *et al.*, 2013). Es interesante destacar que muchas de estas vías son mediadoras de la inflamación y la subsiguiente respuesta inmune, como los $\text{TNF}\alpha$ (Xia *et al.*, 2009; Gao y Lui, 2014), varias interleucinas (Zhang *et al.*, 2014; Sarkar *et al.*, 2008) y las activinas A y B (Nicholls *et al.*, 2012). Existen también vías antagónicas a éstas, tales como la señalización retinoide, que actúa como mecanismo antagónico al de la activina (Hogarth *et al.*, 2015; Hogarth y Griswold, 2010; Sugimoto *et al.*, 2012), inhibiendo su expresión (Nicholls *et al.*, 2013). Además, la BTB también está sujeta a

3. INTRODUCCIÓN

una regulación endocrina por parte de la testosterona junto a la FSH y la LH ya que estas últimas influyen en la formación de las uniones estrechas entre células de Sertoli (Vitale *et al.*, 1973; Russell y Peterson, 1985).

La testosterona y la FSH activan la producción de proteínas de adhesión y promueven su localización en las uniones estrechas que forman la BTB. Asimismo, estimulan la producción claudina-11, un componente importante de las uniones estrechas entre células de Sertoli (Florin *et al.*, 2005; Kaitu'u-Lino *et al.*, 2007). La confirmación de que los andrógenos desempeñan un papel importante para la función de la BTB vino de experimentos con ratones ScARKO. Como vimos anteriormente, en estos ratones se detenía la espermatogénesis, pero también se comprobó la permeabilización de la BTB, por lo que ésta perdía su función (Willems *et al.*, 2010). Esta pérdida de funcionalidad está asociada con la reorganización de las proteínas de adhesión celular implicadas en la formación de uniones estrechas, que son los principales componentes de la BTB.

La estructura y funcionalidad de la BTB han sido investigados en varios animales con reproducción estacional: el visón, (*Mustela visón*) (Pelletier, 1988), el hámster, (*Phodopus sungorus*) (Tarulli *et al.*, 2008), el topo ibérico (*Talpa occidentalis*) (Dadhich *et al.*, 2013), el ratón de campo, *Apodemus sylvaticus* y el ratón moruno, *Mus spretus* (Massoud *et al.*, 2021). Los experimentos realizados con trazadores moleculares han demostrado que en la mayoría de estas especies la BTB se vuelve permeable en el periodo no reproductivo, permitiendo que el trazador llegue al compartimento adluminal del epitelio germinativo. En el visón se comprobó que durante su ciclo espermatogénico existe una fase en que se diferencian las células germinales aún cuando la BTB todavía no es competente e impermeable, lo que demuestra que la formación/desorganización de la BTB no coinciden de forma precisa con la aparición/desaparición de las células meióticas en el epitelio germinativo. Estos resultados muestran que la presencia de una barrera permeable temporalmente no inicia necesariamente una respuesta autoinmune de magnitud suficiente para inducir el deterioro del epitelio germinativo (Pelletier, 1986).

En el topo ibérico, *T. occidentalis*, se comprobó la degeneración de la BTB durante el periodo no reproductivo. Dadhich *et al.* (2013) inyectaron un trazador de biotina en el espacio intersticial de los testículos

3.3. MECANISMOS DE REGRESIÓN TESTICULAR

de topos activos, mostrando que el trazador permanecía en la región intersticial y en el compartimento basal de los túbulos seminíferos, sin pasar al compartimento adluminal. Sin embargo, en topos sexualmente inactivos (periodo no reproductivo), el trazador aparecía también en el compartimento adluminal, demostrando que la BTB es permeable en estos animales. También observaron los cambios estructurales en la BTB asociados con la regresión testicular de esta especie. En la región apical del epitelio germinativo existen complejos de especialización ectoplásmica, formados por moléculas tales como la integrina y la laminina, por lo que la alteración de la expresión de estas moléculas afectará a la adhesión celular Sertoli-Sertoli y Sertoli-célula germinal. También demostraron que el patrón de expresión de algunas de estas moléculas de adhesión cambia durante la regresión testicular. En esta especie, los patrones de expresión de varias moléculas de adhesión celular aparecen alterados en el testículo inactivo. Entre ellos se incluyen complejos multiproteicos como la conexina 43, la beta-catenina, la N-cadherina y la E-cadherina, que tienen funciones de adhesión celular entre células germinales y de Sertoli. Éstos resultados indican que el control de la expresión de estas moléculas puede desempeñar un papel esencial en los mecanismos que regulan la reproducción estacional.

3.3 Mecanismos de regresión testicular

Los mecanismos involucrados en los cambios cíclicos que sufren los testículos de animales con reproducción estacional no son conocidos en detalle actualmente ya que se han estudiado en pocas especies y de manera incompleta. Muchos de estos estudios se centran generalmente en un aspecto particular de todo el proceso de la regresión testicular, como la apoptosis, la proliferación celular, la producción hormonal, los cambios morfológicos o la dinámica de las moléculas de adhesión celular (Young y Nelson, 2001; Blottner *et al.*, 1996; Strbenc *et al.*, 2003; Pelletier, 2011), por lo que sería necesario un estudio más completo para comprender mejor este proceso. Hasta la fecha, se han descrito dos mecanismos celulares principales para explicar la reducción de las células germinales durante la regresión de los testículos en mamíferos con reproducción estacional: la apoptosis y descamación (desprendimiento) celular (Jiménez *et al.*, 2015).

3. INTRODUCCIÓN

Durante años, la apoptosis fue el único proceso celular que se conocía que estaba involucrado en la regresión testicular, y por tanto como principal causa de la eliminación de células germinales en mamíferos (Young *et al.*, 2001; Pastor *et al.*, 2011). Posteriormente, la descamación de las células germinales meióticas y post-meióticas se ha propuesto como mecanismo alternativo de regresión testicular en varios animales entre los que se incluyen el topo ibérico *T. occidentalis* (Dadhich *et al.*, 2013, 2010) y el armadillo peludo *Chaetophractus villosus* (Luaces *et al.*, 2014).

También se ha mostrado que los mecanismos que hay detrás de la transición entre los periodos activos e inactivos no están conservados, ni siquiera entre especies relacionadas evolutivamente, mostrando variaciones entre diferentes especies e incluso poblaciones.

3.3.1 Apoptosis celular

En machos con reproducción estacional, la muerte celular programada o apoptosis, es el principal proceso celular que media en la regresión testicular. La apoptosis permite la eliminación de células dañadas e innecesarias de diversas partes del organismo durante la remodelación y diferenciación de los tejidos (Raff, 1998; Cohen, 1999; Lockshin y Zakeri, 2004) y desempeña un papel esencial en la reducción del número de células durante la embriogénesis, la homeostasis de los tejidos y la eliminación de las células prescindibles o potencialmente dañinas. En los testículos de mamíferos, la espermatogénesis es un evento caracterizado por tener altas tasas de proliferación, pero se ha comprobado que junto a este incremento celular se produce la degeneración espontánea de células espermatogénicas (Kerr *et al.*, 1992; Allan *et al.*, 1988). Esta degeneración, viene mediada por procesos apoptóticos, que pueden afectar a las células germinales tanto a nivel de espermatogonias como de espermatocitos I y II y espermátidas (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1996a, 1998) y es un proceso celular que se encuentra altamente regulado mediante diversas vías de señalización (Young y Nelson, 2001). Pero este proceso de la apoptosis en los diferentes niveles de maduración de las células germinales no ocurren con la misma periodicidad. Se ha comprobado que, en la rata, las espermatogonias de tipo A2, A3 y A4 sufren apoptosis con cierta regularidad (Allan *et al.*, 1988), mientras que los espermatocitos

3.3. MECANISMOS DE REGRESIÓN TESTICULAR

primarios, secundarios y las espermatidas, lo hacen ocasionalmente (Kerr *et al.*, 1992; Brinkworth *et al.*, 1995; Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1996b), mientras que las espermatogonias A1, intermedias y de tipo B rara vez degeneran (Bronson, 1988). La apoptosis es necesaria para el correcto desarrollo embrionario, pues cuando se inhibe aparecen defectos congénitos graves, disfunción de órganos e incluso la muerte del individuo (LeGrand, 1997; Thompson, 1994; Wyllie *et al.*, 1980; Vaux y Strasser, 1996). En el testículo, la apoptosis tiene importantes funciones que son fundamentales para mantener la capacidad reproductora del animal. Entre estas funciones, destacan: 1) regula el número de espermatogonias, 2) mantiene la homeostasis requerida entre los distintos tipos de células germinales, 3) ayuda a la conservación de la estructura del túbulo seminífero, 4) salvaguarda la integridad genética del espermatozoide y 5) sincroniza los ciclos de las espermatogonias y los espermatoцитos de las distintas etapas de la espermatogénesis (Hamer *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2009; Pastor *et al.*, 2011; McClusky, 2012; Shukla *et al.*, 2012).

En animales con reproducción estacional, se han observado diferencias en el número de células germinales apoptóticas existentes entre los periodos reproductivo y no reproductivo, comprobando que durante la fase de transición, el testículo se atrofia debido a un aumento de la apoptosis de las células germinales. Ésto se ha comprobado en animales como el hámster (Furuta *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 2002), el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) (Young *et al.*, 1999) y la liebre parda europea (*Lepus europaeus* L) (Strbenc *et al.*, 2003). Más recientemente, Seco-Rovira *et al.* (2014) demostraron en el hámster sirio que es durante el periodo de regresión testicular cuando se alcanza la máxima tasa apoptótica y no después, cuando el proceso se ha completado, concluyendo que este aumento de la apoptosis es lo que provoca la atrofia masiva del epitelio germinativo. En cambio, se encontró una excepción en el corzo, (*Capreolus capreolus*), en el que la apoptosis no es la causa de la regresión testicular estacional (Blottner *et al.*, 1995, 1996; Schön *et al.*, 2004). Posteriormente, se demostró que ocurre lo mismo en otras especies como el topo ibérico, (*Talpa occidentalis*) (Dadhich *et al.*, 2010) y el armadillo peludo (*Chaetophractus villosus*) (Luaces *et al.*, 2014). En el topo, la tasa de apoptosis de las células germinales varía en función de la estación del año, siendo mayor una vez que el proceso de regresión testicular

3. INTRODUCCIÓN

ha concluido, y no durante dicho proceso. La apoptosis sigue activa durante todo el periodo no reproductivo y termina cuando una oleada de proliferación espermatogonial restaura el número de espermatogonias que se perdieron durante el periodo de inactividad testicular, volviendo así al periodo reproductivo (Dadhich *et al.*, 2010). El descubrimiento de especies en las que la apoptosis no es la principal causa de la regresión testicular indica que los mamíferos no son un grupo homogéneo en cuanto a los mecanismos que regulan la dinámica celular en los testículos por lo que deben existir otros mecanismos que colaboren en la regresión testicular que experimentan los animales con reproducción estacional (Dadhich *et al.*, 2010).

3.3.2 Descamación celular

La descamación o desprendimiento de las células germinales desde su emplazamiento normal en el epitelio germinativo es un proceso bien conocido en distintas situaciones patológicas del testículo de mamíferos. Durante la descamación, se produce una desregulación de la expresión de las moléculas de adhesión celular, lo que conduce a la pérdida de las uniones Sertoli-Sertoli y Sertoli-célula germinal, además del deterioro del citoesqueleto de microtúbulos del citoplasma de las células de Sertoli, que resulta en el desprendimiento de las células germinales meióticas y post-meióticas situadas en el compartimento adluminal de los túbulos seminíferos Russell *et al.* (1981). Se sabe que tanto la testosterona como las gonadotropinas regulan la expresión de las moléculas de adhesión celular en los testículos. Por tanto, las diferencias en los niveles de FSH, LH y testosterona entre la estación reproductiva y la no reproductiva pueden explicar la disminución de células germinales que muestran los reproductores estacionales durante el periodo de transición. En las especies analizadas hasta la fecha, la función androgénica de los machos disminuye durante el periodo no reproductivo. Estos datos sugieren que las señales ambientales reducen los niveles de gonadotropinas, lo que a su vez reduciría los niveles de testosterona y esta producción deprimida de andrógenos es probablemente la señal hormonal que induce la descamación de las células germinales acompañado de una pérdida de permeabilidad de la BTB (revisado por Jiménez *et al.* (2015)). Los estudios realizados en

3.3. MECANISMOS DE REGRESIÓN TESTICULAR

el topo ibérico, *T. occidentalis*, han demostrado que en esta especie la regresión testicular se produce mediante una descamación masiva de las células germinales vivas que se eliminan a través del epidídimo, acompañando de la pérdida de funcionalidad de la BTB, descubriendo así un mecanismo alternativo a la apoptosis como efector de la regresión testicular (Dadhich *et al.*, 2013). Analizando estos datos, los autores afirmaron que este proceso de descamación viene determinado por los bajos niveles de testosterona intratesticular, que inducen la desregulación de la expresión y/o distribución de las moléculas de adhesión celular que conectan las células de Sertoli y las células germinales en el epitelio germinativo. En el topo, los patrones de expresión de varias moléculas de adhesión celular parecen estar alterados en el testículo inactivo, incluyendo la conexina 43, la β -catenina, la N-cadherina y la E-cadherina, que son componentes de los complejos multiproteicos que forman la especialización ectoplásmica y otros complejos de adhesión entre las células de Sertoli y las germinales. Esto implica que las células de Sertoli pierdan su función de soporte lo que conlleva el desprendimiento de las células germinales vivas, que se eliminan a través del epidídimo y la uretra. Una vez concluida la regresión testicular, al inicio del periodo no reproductivo y durante toda la duración de éste, las espermatogonias del topo continúan entrando en meiosis, aunque los espermatoцитos primarios no superan nunca la etapa de paquitene, ya que son eliminados por apoptosis. Esta es la razón de por que la mayor tasa de apoptosis en esta especie se observa en el periodo inactivo. Por tanto, la apoptosis asegura el estado inactivo de los testículos de topo durante el periodo reproductivo, pero no es la causa de la regresión testicular en esta especie. Dadhich *et al.* (2013) mostraron además que este proceso de descamación y la permeabilización de la BTB se regulan por separado, ya que esta última se produce una vez que la mayoría de las células germinales adluminales han desaparecido.

El armadillo peludo *C. villosus* representa un modelo bastante similar al descrito para el topo (Luaces *et al.*, 2013, 2014). En este animal, la pérdida de la adhesión entre las células de Sertoli y las células germinales parece inducir la apoptosis en las células germinales ya descamadas, lo que implica que en esta especie la apoptosis tampoco es el principal causante de la regresión testicular. Además, durante las últimas fases de la regresión testicular del armadillo, se observó una fagocitosis de restos celulares y

3. INTRODUCCIÓN

gotas de lípidos dentro de las células de Sertoli, lo que sugiere que esta actividad fagocítica contribuye a la eliminación de las células germinales residuales aún presentes. De forma similar, en un estudio reciente en la vizcacha, *Lagostomus maximus*, [González et al. \(2018\)](#) propusieron un novedoso mecanismo de regresión testicular en el que un equilibrio entre la apoptosis y la autofagia regula el proceso.

Existe un número de estudios sobre especies con reproducción estacional en los que se asocia la regresión testicular con la apoptosis, pero cuyos datos no son concluyentes. En algunos casos, se observó un aumento del número de células apoptóticas cuando el testículo ya estaba inactivo, después de que se hubiera producido la eliminación de las células germinales. Es el caso de los estudios sobre la rana toro (*Rana catesbeiana*) ([Sasso-Cerri et al., 2006](#)), el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) ([Young et al., 1999](#)), la liebre (*Lepus europaeus*) ([Strbenc et al., 2003](#)), y la cobaya (*Cavia porcellus*) ([Hingst y Blottner, 1995](#)).

No sabemos si los mecanismos de regresión testicular basados en la descamación masiva de células germinales y en la apoptosis son los más frecuentes en la regresión testicular en mamíferos con reproducción estacional y, si es así, cuál de los dos es el preponderante. Evidentemente, para responder a estas preguntas es necesario realizar estudios exhaustivos similares a los realizados en el topo en muchas otras especies de mamíferos ([Jiménez et al., 2015](#)).

3.4 Genes de interés en la regresión testicular

Actualmente se sabe que muchos productos génicos desempeñan papeles importantes en las principales funciones testiculares. Para conocer el control genético de la reproducción estacional, es conveniente estudiar el patrón de expresión de los siguientes genes durante el ciclo reproductivo:

SOX9 (SRY-box transcription factor 9)

Se trata de un miembro de la familia de genes *SOX* perteneciente al grupo *SOXE*, donde también se incluye a *SOX8* y *SOX10* ([Guth y Wegner, 2008](#)). *SOX9* es un factor de transcripción implicado en

3.4. GENES DE INTERÉS EN LA REGRESIÓN TESTICULAR

numerosos procesos del desarrollo, como la condrogénesis, formación de válvulas cardíacas y la cresta neural, los testículos y la médula espinal (Barrionuevo *et al.*, 2009). Además, desempeña un papel muy importante en la función de diferentes órganos del adulto. En mamíferos, *SOX9* se expresa en la gónada bipotencial, durante la determinación sexual, volviéndose una expresión específica para machos después de esta etapa. En el ratón, cuando la expresión de *Sry* se extingue, la expresión de *Sox9* se restringe al linaje de las células de Sertoli dentro de los cordones testiculares y persiste durante la etapa adulta (Kobayashi *et al.*, 2005),(Sekido y Lovell-Badge, 2008)). Además, la proteína SOX9, a diferencia de SRY, está muy conservada a lo largo de la evolución de los vertebrados. Estas peculiaridades hacen que *Sox9* sea un excelente marcador de las células de Sertoli tanto embrionarias como adultas. El papel clave de *Sox9* en la determinación del sexo se comprobó inhibiendo condicionalmente ambos alelos de *Sox9* en la gónada, lo que condujo a una reversión sexual completa de macho a hembra. Los individuos mutantes para *Sox9* muestran marcadores específicos del ovario temprano (*Wnt4* y *Foxl2*) y una falta de formación del cordón testicular y células de Leydig (Barrionuevo *et al.*, 2006). Por otra parte, la activación ectópica de *Sox9* en ratones XX Odd Sex (Ods: un modelo de mutación dominante para la alteración a largo plazo de la expresión de *Sox9*), o la expresión de un transgén de *Sox9* en embriones XX producen ratones macho con reversión sexual completa, pero estériles (Vidal *et al.*, 2001). Los ratones *knockout* heterocigotos para *Sox9* mueren al nacer, con un síndrome similar al de la displasia campomélica humana.

Actualmente, hay pocos estudios sobre la expresión y el papel de *SOX9* en los testículos de los mamíferos adultos. Barrionuevo *et al.* (2016) demostraron que este gen, junto con *Sox8*, son necesarios para el mantenimiento del testículo adulto, ya que su ablación condicional induce la transdiferenciación Sertoli-granulosa y desemboca finalmente en la degeneración completa de los túbulos seminíferos. Su expresión es máxima en las fases de división de las células germinales activas, y alrededor del estadio VIII de la espermatogénesis (Fröjdman *et al.*, 2000). El patrón de expresión de *SOX9* en los túbulos seminíferos de ratas adultas sugiere que puede tener un papel fundamental en la diferenciación de las células germinales. Este mismo patrón de expresión se observó en los

3. INTRODUCCIÓN

testículos adultos del topo ibérico *T. occidentalis* (Dadhich *et al.*, 2011), donde se observó una expresión más intensa de *SOX9* en las células de Sertoli durante el periodo no reproductivo.

DMRT1 (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1)

Es un regulador transcripcional necesario para el desarrollo testicular y está muy conservado en vertebrados (Krentz *et al.*, 2009). En ratón, *Dmrt1* se expresa en las células de Sertoli y en las células germinales donde, a la semana del nacimiento, alcanza niveles elevados de expresión en los túbulos que se encuentran en las fases iniciales del ciclo espermatogénico. Los estudios realizados con ratones mutantes para el gen *Dmrt1* revelaron que en la gónada masculina tiene funciones en la supervivencia y diferenciación de las células somáticas y germinales (Raymond *et al.*, 2000). Estudios posteriores demostraron que este gen también es esencial para mantener la identidad de los testículos, ya que la pérdida de este factor de transcripción en las células de Sertoli de ratón, incluso en adultos, reprograma el patrón de expresión génica de las células de Sertoli y las convierte en células ováricas de la granulosa (Matson *et al.*, 2011). Estudiando la expresión de *DMRT1* en testículos de los topos ibéricos adultos, Dadhich *et al.* (2011) vieron que ésta variaba en función de la etapa del ciclo espermatogénico, siendo mayor en el estadio VII, y de la estación del año, mostrando una expresión más intensa durante el periodo reproductivo.

DMC1 (Disrupted meiotic cDNA gene 1)

Es un gen con función específica en la recombinación meiótica, que se expresa durante el emparejamiento (sinapsis) cromosómico mediado por la recombinación y los intercambios de cromátidas que da lugar a los quiasmas (Yoshida *et al.*, 1998). Los ratones mutantes para *Dmc1* sufren alteraciones cromosómicas durante la recombinación meiótica, lo que conduce a la infertilidad (Pittman *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998). Además, se han visto interacciones entre *DMC1* y *BRCA2* (breast cancer gene 2), que también desempeña un papel importante en la recombinación meiótica de mamíferos ya que, en ratones, se expresa en gran medida durante la espermatogénesis (Connor *et al.*, 1997), y particularmente se localiza en los cromosomas meióticos durante la profase I temprana,

3.4. GENES DE INTERÉS EN LA REGRESIÓN TESTICULAR

cuando se produce la sinapsis entre los homólogos. Por ello, la proteína DMC1 es un buen marcador para las células meióticas tempranas. En el topo ibérico, DMC1 aparece durante los estadios espermatogénicos que contienen células meióticas en fases tempranas. En los testículos inactivos, la expresión es similar, ya que en esta especie el inicio de la meiosis no se interrumpe durante la época no reproductiva, aunque estos espermatoцитos sufren apoptosis tras alcanzar el estadio de cigotene (Dadhich *et al.*, 2011).

P450scc (Cholesterol side-chain cleavage enzyme)

El primer paso en la síntesis de las hormonas esteroideas es la conversión del colesterol en pregnenolona en las mitocondrias, cuya reacción está catalizada por el enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450scc), cuya producción está regulada hormonalmente (Miller, 1988). La P450scc humana está codificada por el gen CYP11A1 (Nebert *et al.*, 1991), que se expresa en las glándulas suprarrenales, gónadas, placenta y cerebro (Mellon y Deschepper, 1993). Los estudios bioquímicos y morfológicos sugieren que el P450scc se localiza en la matriz de la membrana mitocondrial interna de las células de Leydig (Miller, 1988). Los estudios inmunohistoquímicos realizados en los testículos del topo ibérico mostraron la expresión de P450scc en las células de Leydig, tanto de los testículos activos como de los inactivos, pero con una señal más débil en el periodo inactivo. Esto se confirmó mediante un análisis con RT-Q-PCR mostrando una reducción de 4,7 veces en los niveles de expresión de CYP11A1 en testículos de topos inactivos (Dadhich *et al.*, 2013).

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína muy conservada en todo el reino animal que desempeña un papel crítico en varios procesos biológicos tales como la fijación de la ADN polimerasa, el metabolismo de los ácidos nucleicos, el mecanismo de replicación del ADN, la síntesis del ADN cromosómico y la recombinación y reparación del ADN. Además, se ha demostrado que PCNA interactúa con proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular (Dieckman y Washington, 2013). Entre las muchas vías de reparación que se conocen, la reparación de los apareamientos incorrectos generados durante la replicación (MMR) es

3. INTRODUCCIÓN

una de las mejor caracterizadas por la participación del PCNA (Moldovan *et al.*, 2006). Por tanto, PCNA se expresa en todas las células en división, tanto mitótica como meiótica, y es un excelente marcador de espermatogonias y espermatoцитos primarios (Chapman y Wolgemuth, 1994). En coherencia con esto, en el topo ibérico, PCNA se expresa con intensidad en las células de la capa externa de los túbulos seminíferos, que se corresponde con las espermatogonias, y más débilmente en una capa interna de células, marcando los espermatoцитos en fases de cigotene y paquitene (Dadhich *et al.*, 2011).

3.5 Nuevas especies para los estudios sobre reproducción estacional

El número de especies de mamíferos utilizados investigar los mecanismos generales de regresión testicular estacional es todavía insuficiente. Además, tal como se indicó anteriormente, muchos de los estudios no abordan todos los procesos relevantes (apoptosis, variaciones hormonales, cambios morfológicos y dinámica de las moléculas de adhesión celular), por lo que no ofrecen toda la información necesaria para comprender los mecanismos de regresión testicular de forma suficiente. En muy pocas especies se han realizado estudios completos que incluyen todas estas características. Entre ellas están el topo ibérico (Dadhich *et al.*, 2010, 2013), el armadillo de pelo largo (Luaces *et al.*, 2014), el hámster sirio (Pastor *et al.*, 2011; Seco-Rovira *et al.*, 2014, 2015), la musaraña común (Massoud *et al.*, 2014), el ratón de campo (Massoud *et al.*, 2021) y el ratón moruno (Massoud *et al.*, 2021). Todas las poblaciones analizadas de estas especies, excepto el ratón moruno, presentaron reproducción estacional, pero no en todas ellas se produce regresión testicular, ya que en la musaraña los machos mantienen la actividad espermatoгénica durante el periodo no reproductivo. Puesto que el número de especies analizadas es bajo y, además, muestran cierta heterogeneidad, es necesario investigar otras poblaciones de nuevas especies de mamíferos con reproducción estacional que nos permitan averiguar si hay un mecanismo conservado de regresión testicular en este grupo, o si existen varios mecanismos alternativos.

Los micromamíferos son animales ideales para este tipo de estudios,

3.5. NUEVAS ESPECIES PARA LOS ESTUDIOS SOBRE REPRODUCCIÓN ESTACIONAL

ya que es necesario realizar múltiples capturas de animales silvestres para obtener significación estadística en las comparaciones entre diferentes estaciones. Éstos cumplen los requisitos ya que además de ser animales abundantes en la naturaleza, son fáciles de capturar y de manipular por su reducido tamaño.

Para ampliar el estudio de especies con reproducción estacional, en esta tesis doctoral hemos realizado un detallado análisis morfométrico, histológico, hormonal y molecular de las variaciones testiculares de una especie de micromamífero, el erizo orejudo o erizo egipcio, *Hemiechinus auritus*. Además, hemos ampliado el estudio del topo ibérico, *T. occidentalis*, y del topillo mediterráneo, *Microtus duodecimcostatus*, analizando y comparando los transcriptomas testiculares de ambas especies durante los periodos reproductivo y no reproductivo. A continuación se aportan algunos detalles de la biología reproductiva y la distribución de estas especies.

1) *Hemiechinus auritus*



Figura 3.5: *Hemiechinus auritus*: Imagen de un ejemplar de *Hemiechinus auritus* fuente: <https://www.treknature.com/gallery/photo111690.htm>

El erizo orejudo (Fig. 3.5), *Hemiechinus auritus* (Gmelin, 1770), pertenece a la familia Erinaceidae, que engloba seis especies africanas de erizos. *H. auritus* se distribuye en las zonas costeras semidesérticas de Libia y Egipto, en la Isla de Chipre, en Oriente Medio y en Asia Central, siendo un mamífero terrestre de hábitos nocturnos, que viven en madrigueras y tiene preferencia por hábitats con un equilibrado suministro de humedad (mesohábitat), como jardines,

3. INTRODUCCIÓN

olivares y zonas cultivadas (M Happold, 2013). Esta especie tiene un ciclo vital que muestra su máxima actividad en verano (mes de julio), mientras que en invierno, la mayoría de los individuos hibernan durante periodos de hasta 40 días. Este ciclo va acompañado de fluctuaciones anuales de la masa corporal, siendo máxima en verano y mínima en invierno. Por lo tanto, *H. auritus* es un reproductor estacional e independientemente de la localización geográfica, los erizos de esta especie se reproducen a finales de la primavera-verano y están inactivos a finales del otoño y el invierno (Miriam Schoenfeld, 2009; Goyal y Mathur, 1974; Asawa y Mathur, 1982). Antes de esta tesis doctoral, no se había realizado ningún estudio sobre el proceso de regresión testicular estacional en *Hemiechinus auritus* y este es uno de los objetivos de este trabajo. Realizamos un estudio exhaustivo de los testículos en poblaciones de esta especie de erizo durante los dos períodos (reproductivo y no reproductivo), incluyendo análisis histológicos e inmunohistológicos (detección de marcadores de células somáticas y germinales), morfometría (masa corporal y testicular, diámetro de los túbulos seminíferos), permeabilidad de la barrera BTB, niveles séricos de testosterona e incidencia de apoptosis. Este estudio ya ha sido publicado (Massoud *et al.*, 2018).

2) *Talpa occidentalis*



Figura 3.6: *Talpa occidentalis*: Imagen de un ejemplar de *Talpa occidentalis*

Los topos de la familia Talpidae presentan varias características singulares en cuanto a su biología reproductiva. En las hembras del género *Talpa*, las gónadas se desarrollan siguiendo un patrón similar

3.5. NUEVAS ESPECIES PARA LOS ESTUDIOS SOBRE REPRODUCCIÓN ESTACIONAL

al de los testículos. En este desarrollo se incluye la formación de cordones medulares, migración de células mesonéfricas, vascularización profusa y la diferenciación de células de Leydig y células mioides peritubulares (Barrionuevo *et al.*, 2004). Así, en lugar de ovarios normales, desarrollan ovotestes que están compuestos por una pequeña porción de tejido ovárico normal y una porción generalmente grande de tejido testicular estéril (disgénico). No obstante, son fértiles como hembras, por lo que se trata de especies excepcionales entre los mamíferos (Jiménez *et al.*, 1993, 1996). Otra peculiaridad es que los ovotestes carecen de células de Sertoli completamente diferenciadas, ya que no expresan los marcadores típicos de estas células (AMH o SOX9). Sin embargo, las células de Leydig presentes en estos ovotestes producen abundante testosterona en las etapas postnatales del desarrollo y durante los periodos no reproductivos del año, lo que provoca que tengan un gran desarrollo muscular. Los topos son reproductores estacionales estrictos. En el sur de la Península Ibérica, los topos de la especie *Talpa occidentalis* (Cabrera, 1907) (Fig. 3.6) se reproducen durante el invierno (Jiménez *et al.*, 1990). Por el contrario, los topos de la especie *Talpa europaea*, que viven en el norte de la Península Ibérica y en toda Europa, se reproducen durante la primavera.

A lo largo del ciclo reproductivo anual, se producen cambios morfológicos importantes en las gónadas de ambos sexos. En los machos, los testículos son mucho más grandes durante el periodo reproductivo, llegando la masa testicular de los machos capturados en diciembre a cuadruplicar la de los de julio. En coherencia con esto, las características histológicas de los testículos de ambos periodos son muy diferentes ya que la mayoría de las células presentes en el epitelio germinativo de los testículos fértiles desaparecen durante la regresión testicular, revirtiendo la situación en el otoño siguiente. La confluencia de varias particularidades y singularidades que tiene *T. occidentalis* hace que esta especie sea un modelo animal de gran interés científico para investigar muchos aspectos del control genético, endocrino y paracrino de la función gonadal. Sin embargo, en la actualidad se desconoce el control genético del proceso de regresión testicular de esta especie. Por esta razón y con el fin de encontrar diferencias en la expresión génica entre

3. INTRODUCCIÓN

el periodo activo e inactivo, en la presente tesis hemos realizado un estudio transcriptómico que completa así los estudios que se hicieron anteriormente sobre esta especie en nuestro laboratorio.

3) *Microtus duodecimcostatus*



Figura 3.7: *Microtus duodecimcostatus*: Imagen de un ejemplar de *Microtus duodecimcostatus*. Fotografía de Victor Ramos fotonatura.org

El topillo mediterráneo, *Microtus duodecimcostatus* (de Sélvs-Lonchamps, 1839) forma parte de un grupo de roedores pertenecientes a la familia Cricetidae, subfamilia Arvicolinae, que engloba 20 géneros (Fig. 3.7). Los topillos del género *Microtus* son pequeños mamíferos de alimentación predominantemente herbívora, que están presentes en el hemisferio norte ocupando preferentemente hábitats abiertos, como praderas, pastos e incluso terrenos agrícolas, aunque algunas especies/poblaciones también se asocian a zonas de bosque (Cotilla y Palomo, 2007). Se distribuye por la mayor parte de la Península Ibérica, excepto en la región noroeste y algunas zonas dispersas de España, apareciendo también en el sur de Francia (Shenbrot *et al.*, 2005; Cotilla y Palomo, 2007). Se caracterizan por llevar una vida subterránea, ya que pasan la mayor parte del tiempo en túneles y madrigueras. Estos topillos realizan una extensa red de túneles poco profundos, arrojando al exterior de los mismos pequeños montones de tierra a medida que los excavan. A diferencia de los topos (género *Talpa*), no muestran ninguna adaptación morfológica típica a la vida subterránea (ML, 1984; da Luz Mathias, 1990; SM Giannoni, 1993; Santos *et al.*, 2009). Se alimentan de partes subterráneas de las plantas (bulbos, raíces, rizomas, etc.), aunque

3.5. NUEVAS ESPECIES PARA LOS ESTUDIOS SOBRE REPRODUCCIÓN ESTACIONAL

a veces también pueden ingerir las partes aéreas (Cotilla y Palomo, 2007). En ocasiones, *M. duodecimcostatus* constituye una plaga en cultivos hortícolas y huertos (Cotilla y Palomo, 2007). En la provincia de Granada, esta especie es relativamente abundante en diversos hábitats como páramos, taludes de carreteras, cultivos de cereal, plantaciones de almendros, alamedas y huertas de regadío, donde causa daños ocasionales cuando forma plagas con una frecuencia plurianual (datos no publicados). En las zonas donde ha sido estudiada esta especie, puede considerarse sexualmente activa durante todo el año, con un pico de actividad reproductiva en invierno y primavera, (de noviembre a mayo con el máximo en febrero-marzo) (Santos *et al.*, 2009).

El ciclo reproductivo estacional de esta especie ha sido publicado recientemente (Lao-Pérez *et al.*, 2021). La descripción del ciclo reproductivo y los análisis morfométricos, histológicos, inmunohistoquímicos y hormonales contenidos en este artículo formaron parte de la tesis doctoral que el Dr. Diaa Massoud realizó en nuestro laboratorio, mientras que el estudio de los transcriptomas de los testículos activos e inactivos forman parte de la presente tesis doctoral. El patrón reproductivo de esta especie fue estudiado en poblaciones situadas en los alrededores de la ciudad de Granada. Es interesante destacar que los individuos que viven en páramos baldíos se reproducen de forma estacional, con un periodo estival de inactividad sexual, mientras que los que viven en plantaciones de chopos cercanas (a sólo 8 km de distancia) se reproducen durante todo el año, al igual que los topillos capturados en páramos y mantenidos en cautividad. Estos animales representan, por tanto, un paradigma de reproductor oportunista independiente del fotoperiodo, ya que los individuos dejan de reproducirse o no, dependiendo de las condiciones ambientales a las que se enfrenten en cada momento. Los machos sexualmente inactivos capturados en los páramos durante el verano sufren una regresión testicular completa.

3. INTRODUCCIÓN

4. Objetivos

1. Determinar si la especie *Hemiechinus auritus* se reproduce estacionalmente y, en caso afirmativo, establecer su ciclo reproductivo circual y caracterizar el proceso de regresión testicular.
 - Examinar las características histológicas y morfométricas de las gónadas masculinas en cada etapa reproductiva para determinar el estado funcional de los principales tipos celulares (Sertoli, Leydig, mioides peritubulares y células germinales), estructuras (túbulos seminíferos) y procesos biológicos (espermatogénesis) a lo largo del ciclo reproductivo estacional.
 - Identificar el patrón espacio-temporal de expresión de varios genes implicados en la función testicular en machos adultos activos e inactivos.
 - Estudiar el posible papel de la apoptosis durante el proceso de regresión testicular.
 - Caracterizar la dinámica estacional de las uniones celulares de la línea germinal a lo largo del ciclo reproductivo.
 - Estudiar el posible papel de la descamación durante el proceso de regresión testicular.
 - Analizar los niveles séricos de testosterona en testículos de machos activos e inactivos.
2. Analizar el perfil transcriptómico de los testículos activos e inactivos de la especie *Microtus duodecimcostatus*
 - Elaborar los transcriptomas testiculares de esta especie.
 - Realizar un estudio comparativo de expresión génica entre los periodos activo e inactivo

4. OBJETIVOS

3. Analizar el perfil transcriptómico de los testículos activos e inactivos de la especie *Talpa occidentalis*
 - Realizar un estudio comparativo de expresión génica entre los periodos activo e inactivo, utilizando los transcriptomas realizados anteriormente por nuestro grupo.
4. Comparar los transcriptomas de testículos activos e inactivos de *Microtus duodecimcostatus* y *Talpa occidentalis* para identificar alteraciones conservadas evolutivamente.

5. Material y Métodos

5.1 Material analizado

Para la realización de este estudio se han analizado machos adultos de tres especies de pequeños mamíferos: el erizo orejudo, *Hemiechinus auritus* (n=12), el topillo mediterráneo, *Microtus duodecimcostatus* (n=6), y el topo ibérico, *Talpa occidentalis* (n=6). Todas las hembras capturadas de las especies mencionadas fueron excluidas del estudio aunque se comprobó y registró su estado reproductivo (gestación y lactancia). Del mismo modo, también se excluyeron los machos juveniles capturados, que fueron identificados por su baja masa corporal y testicular, registrando también las fechas de captura.

- Las capturas de *Hemiechinus auritus* fueron realizadas en Matrouh (Egipto) bajo la dirección de nuestro colaborador, el Dr. Diaa Massoud. Este estudio se llevó a cabo siguiendo estrictamente las recomendaciones de la *Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Egipto*. Los protocolos de captura y experimentación fueron aprobados por el *Comité de Ética para la Experimentación con Animales del Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Fayoum*. El erizo orejudo está clasificado por el *Sistema de Protección de la Fauna Egípcia* como (LR/lc), (riesgo menor/preocupación menor), por lo que no es una especie amenazada o protegida.
- Las capturas de *Microtus duodecimcostatus* y *Talpa occidentalis*, realizadas en la provincia de Granada, se llevaron a cabo con el permiso de las autoridades ambientales andaluzas (*Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente*) y su manipulación se llevó a

5. MATERIAL Y MÉTODOS

cabo siguiendo las directrices y la aprobación tanto del *Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada* como de la *Consejería de Agricultura y Pesca y Desarrollo Rural de Andalucía* (Número de registro: 450-19131; 16 de junio de 2014). Estas especies están clasificadas como de “riesgo menor/preocupación menor”, por lo que no se trata de especies amenazadas o de protección especial.

5.1.1 Métodos de captura

- Las capturas de *Hemiechinus auritus* fueron realizadas en la Gobernación de Matrouh, parte noroeste de Egipto, a unos 400 km de El Cairo (Fig. 5.1). Los animales fueron capturados por un cazador profesional con permiso de la *Federación Egipcia de Caza Silvestre*. Para minimizar el sufrimiento de los animales, los erizos fueron capturados a mano en sus madrigueras y transportados inmediatamente al laboratorio donde se les aplicó la eutanasia por inhalación de CO².
- Las capturas de *Microtus duodecimcostatus* se llevaron a cabo en tres ubicaciones, todas ellas situadas en la provincia de Granada, en el sureste de la península Ibérica (Fig. 5.2) Para ello, se utilizaron trampas subterráneas de forma cilíndrica y construidas con una malla metálica. Éstas trampas constan de una sola puerta, la cual se cierra una vez que el animal entra en la misma, y fueron diseñadas y fabricadas en nuestro laboratorio. Como señuelo, se cebaron con trozos de manzana, zanahoria y patata. Durante los meses fríos, las trampas se colocaron de día, mientras que en los meses cálidos, las capturas se llevaron a cabo durante la noche. De esta manera evitamos el malestar del animal e incluso su muerte debido a las temperaturas extremas.
- Las capturas de *Talpa occidentalis* se realizaron en una única ubicación, situada en Granada y donde previamente se habían capturado ejemplares de *M. duodecimcostatus* (Fig. 5.2) Las capturas de *T. occidentalis* se llevaron a cabo de la misma forma, mediante el uso de trampas subterráneas, pero en cambio estas están construidas con tubos de PVC y son de mayor tamaño, con doble puerta, y una zo-

5.1. MATERIAL ANALIZADO

na en la cual el animal puede resguardarse. Al igual, éstas trampas fueron diseñadas y fabricadas en nuestro laboratorio.

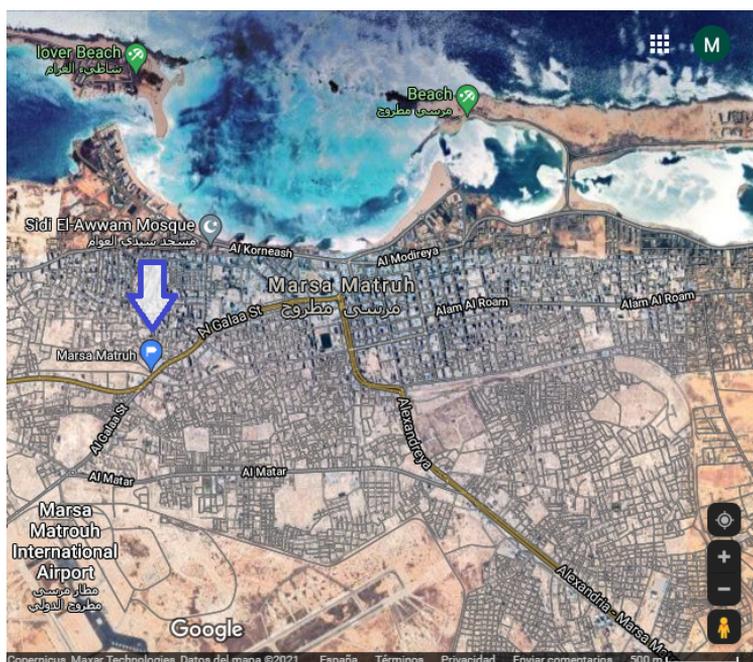


Figura 5.1: Mapa de captura de *Hemiechinus auritus*: Mapa de la zona geográfica donde se capturaron los ejemplares. Corresponde a Marsa Matrouh, Egipto, (Coordenadas: 31°20'58,4"N 27°13'23,8"E)

5. MATERIAL Y MÉTODOS

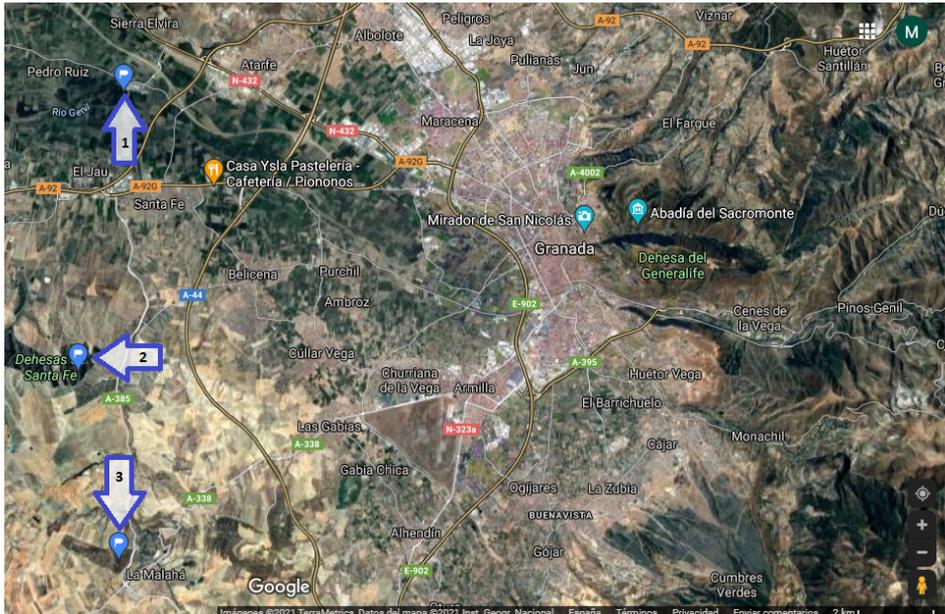


Figura 5.2: Mapa de captura de *Microtus duodecimcostatus* y *Talpa occidentalis*: Mapa del área geográfica donde se realizaron las capturas en Granada, situada al sureste de la península Ibérica. Las capturas de *Microtus duodecimcostatus* se realizaron en tres ubicaciones pertenecientes a tres municipios Granadinos, donde la Ubicación 2 pertenece a Las Gabias (Coordenadas: 37°8'52,6"N 3°44'40,9"W) y la 3 a La Malahá (Coordenadas: 37°6'9,5"N 3°43'56,9"W). En la ubicación 1, perteneciente a la localidad de Santa Fe (Coordenadas: 37°12'53,5"N 3°43'51,7"W), fué donde se realizaron las capturas de *M. duodecimcostatus* en una superficie de páramo. En una alameda colindante a la ubicación 1, a unos 500 metros de distancia, se capturaron todos los ejemplares de *Talpa occidentalis*.

5.1.2 Colección de los tejidos

Hemiechinus auritus

El estudio de *Hemiechinus auritus* surgió de una colaboración con el departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Fayum, situada en Egipto, por lo que la recogida de muestras, y los pasos iniciales del procesado de las muestras fue realizado por el grupo del Dr. Dīaa F. Massoud. Éste grupo, capturó doce machos adultos de *H. auritus* en total, de los cuales seis fueron capturados en la temporada de verano (entre mayo y agosto) cuatro en invierno (entre enero y febrero) y dos individuos durante el período de regresión testicular, (a finales de septiembre). El mismo día de la captura los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂ e inmediatamente después se extrajeron los testículos y epidídimos, se pesaron y se fijaron (Cuadro 5.1). Tras incluir estos tejidos en parafina, fueron enviados a nuestro laboratorio de Granada, donde se continuó con el tratamiento y posterior estudio (Ver siguiente apartado, "Tratamiento de los tejidos")

Individuo	Estación captura	Masa corporal (g)	Masa gonadal (mg)	Estado reproductivo
HA1	Verano	223	755	Activo
HA2	Verano	209	853	Activo
HA3	Verano	207	870	Activo
HA4	Verano	229	995	Activo
HA5	Verano	273	980	Activo
HA6	Verano	213	870	Activo
HA7	Otoño	235	470	Inactivando
HA8	Otoño	212	453	Inactivando
HA9	Invierno	203	324	Inactivo
HA10	Invierno	195	270	Inactivo
HA11	Invierno	189	227	Inactivo
HA12	Invierno	178	290	Inactivo

Cuadro 5.1: Ejemplares de *Hemiechinus auritus* analizados. Las capturas de invierno se realizaron en los meses de enero-febrero, las de otoño a finales de septiembre y las de verano entre mayo y agosto

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Microtus duodecimcostatus

Se examinaron un total de 6 machos adultos de topillo mediterráneo para los estudios transcriptómicos. Fueron capturados en páramos, ya que es uno de los hábitats donde se ha comprobado que estos mamíferos tienen reproducción estacional [datos obtenidos en estudios previos realizados en nuestro grupo; (Lao-Pérez *et al.*, 2021)]. Tres de los 6 individuos corresponden al periodo reproductivo, que tiene lugar durante el invierno (febrero) y otros tres fueron capturados en verano, que corresponde al periodo no reproductivo (julio) (Cuadro 5.2). Antes de preparar el material testicular para la realización de los transcriptomas, nos aseguramos de que los individuos empleados se ajustaban a los estados reproductivos previstos (activo e inactivo), analizando sus parámetros morfométricos mediante técnicas histológicas.

Individuo	Mes de captura	Masa corporal (g)	Masa gonadal (mg)	Estado reproductivo
MD12	Febrero	16.8	57	Activo
MD19	Febrero	19	57	Activo
MD34	Febrero	20	50.7	Activo
MD63	Julio	15	4	Inactivo
MD64	Julio	20	15.6	Inactivo
MD65	Julio	19	18	Inactivo

Cuadro 5.2: Ejemplares de *Microtus duodecimcostatus* analizados

Talpa occidentalis

Para el estudio transcriptómico realizado en el topo ibérico, *Talpa occidentalis*, se emplearon seis individuos en total, de los cuales 2 pertenecían al periodo reproductivo (diciembre), otros 2 al no reproductivo (julio) y 2 más al periodo comprendido entre ambas etapas (abril), cuando se produce la regresión testicular (Cuadro 5.3). Todos los ejemplares fueron capturados en alamedas, ya que es en este hábitat boscoso, húmedo y con abundante alimento en forma de lombrices de tierra, *Lumbricus terrestris*, donde los topos son especialmente abundantes. Igual que en el caso del

5.1. MATERIAL ANALIZADO

topillo, antes de realizar los transcriptomas nos aseguramos mediante análisis morfométricos de que los individuos cumplieran con la condición reproductiva esperada en cada caso.

Individuo	Mes de captura	Masa corporal (g)	Masa gonadal (mg)	Estado reproductivo
TD21	diciembre	64.4	790	Activo
TD22	diciembre	72.4	617	Activo
TA35	abril	70.2	193	Inactivando
TA36	abril	58	202	Inactivando
TL91	julio	69	79	Inactivo
TL92	julio	59	74	Inactivo

*Cuadro 5.3: Ejemplares de *Talpa occidentalis* analizados*

5.1.3 Tratamiento de los tejidos

En el caso de *H. auritus*, como hemos mencionado anteriormente, recibimos en nuestro laboratorio las muestras testiculares incluidas en parafina, aunque previamente fueron tratadas de forma idéntica a como lo hemos hecho nosotros con las muestras testiculares de topo ibérico y topillo mediterráneo.

El mismo día de la captura, los animales fueron trasladados inmediatamente al laboratorio, con el fin de minimizar el estrés de los mismos. Una vez en el, fueron sacrificados por inhalación de CO₂ y seguidamente se extrajeron los testículos y los epidídimos y se pesaron. Para los estudios transcriptómicos realizados en *M. duodecimcostatus* y *Talpa occidentalis*, un testículo se empleó para las pruebas histológicas (para asegurarnos del estado reproductivo en el que se encontraba el animal) y usamos el otro testículo para extraer el ARN que empleamos para realizar el transcriptoma correspondiente.

El primer paso para realizar estudios histológicos es la fijación del testículo y epidídimo. Para ello, empleamos el fijador de Serra (una mezcla de 100 % de etanol, 40 % de formaldehído y ácido acético glacial en proporciones de 60:30:10, respectivamente) durante un máximo de

5. MATERIAL Y MÉTODOS

36 horas (dependiendo del volumen del testículo), en agitación y a 4 °C, para facilitar que la solución penetre en todo el tejido. El volumen de fijador añadido fue como mínimo de 50x (50 veces más volumen de fijador que el de la pieza de tejido). 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 por completo e incluyen en parafina siguiendo el siguiente protocolo:

- Etanol al 70 %, 60 min
- Etanol al 96 %, 120 min
- Etanol absoluto, 60 min
- Etanol absoluto, 4 °C, hasta el día siguiente
- Etanol absoluto/Xileno (1:1), 120 min
- Xileno, T^a ambiente, 120 min
- Xileno, 60 °C, 60 min
- Xileno/Parafina (1:1), 60 °C, 120 min
- Parafina, 60 °C, 60 min
- Parafina, 60 °C, 60 min

Al finalizar estos pasos, las muestras se pasan a parafina nueva, manteniéndolo en parafina líquida hasta el momento en que se orientan y se preparan los bloques, que finalmente se almacenan a 4 °C hasta su uso.

5.2 Métodos histológicos

Las piezas incluidas se cortaron de forma seriada en secciones de 6 μm utilizando un microtomo rotativo automático SLEE CUT 6062 y se almacenaron en cajas planas. Los cortes se montaron sobre portaobjetos tratados con polilisina (VWR, Bélgica; ref. 631-0107) que se habían

cubierto previamente con H₂O bidestilada y colocado sobre una placa termoestática (J.P. Selecta) estabilizada a 40 °C. Transcurridas 24 horas, las preparaciones se almacenaron a 4 °C debidamente identificadas hasta su utilización.

5.2.1 Tinción Hematoxilina-Eosina

Mediante esta técnica, los núcleos de las células, que son ácidos, se tiñen de color violeta oscuro debido a su afinidad por la hematoxilina, mientras que los citoplasmas, que son básicos y tienen afinidad por la eosina, lo hacen de color rosado. Para realizar esta tinción hemos seguido el siguiente protocolo:

- Calentar las preparaciones en una estufa a 60 °C para que la parafina se ablande (aproximadamente 20 minutos).
- Desparafinar en 2 lavados de Xileno de 10 minutos cada uno.
- Rehidratar las preparaciones en una serie decreciente de alcoholes (EtOH 100 % (2 lavados), 70 % y 50 %), 5 minutos en cada uno.
- Lavado rápido con H₂O destilada.
- Teñir con hematoxilina durante 25 segundos (el tiempo puede variar en función del estado de la solución).
- Quitar el colorante sobrante mediante baño en H₂O destilada
- Teñir con eosina durante 90 segundos (este tiempo también varía según el estado del colorante).
- Quitar el colorante sobrante mediante baño en H₂O destilada
- Deshidratar las preparaciones utilizando una serie creciente de alcoholes (EtOH 50 %, 70 %, y 100 %) durante 6-8 segundos en cada solución. El tiempo utilizado es el mínimo posible para no perder intensidad en la tinción con eosina.
- Sumergir en Xileno durante 1 minuto.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

- Aplicar el medio de montaje DePeX (DPX) (Sigma; ref. 44581) y colocar un cubreobjetos con cuidado de no atrapar burbujas de aire. Dejar solidificar durante 30 minutos como mínimo antes de observar al microscopio.

5.2.2 Técnicas inmunológicas

Inmunohistoquímica

Esta técnica permite detectar la presencia o ausencia de determinadas proteínas en un tejido mediante el uso de anticuerpos específicos. La señal se obtiene gracias a un anticuerpo secundario conjugado con la fosfatasa alcalina que en presencia de diaminobencidina (DAB) origina un precipitado marrón que es visible al microscopio. Hemos utilizado el siguiente protocolo:

- Calentar las preparaciones en una estufa a 60 °C para que la parafina se ablande (aproximadamente 20 minutos).
- Desparafinar en 2 lavados de Xileno de 10 minutos cada uno.
- Rehidratar las preparaciones en una serie decreciente de alcoholes (EtOH 100 % (2 lavados), 70 % y 50 %), 5 minutos en cada uno.
- Hacer 2 lavados con PBT de 5 minutos cada uno.
- Recuperación de antígeno: transferir las preparaciones a un recipiente que contenga 500 ml de tampón Tris-EDTA pH=9 y calentar en el microondas a 800W durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se restablece el nivel de agua evaporada añadiendo 100 ml de H₂O destilada y se vuelve a calentar a la misma potencia durante otros 10 minutos.
- Dejar enfriar 25-30 minutos a temperatura ambiente
- Lavar las preparaciones dos veces con PBT durante 10 minutos cada una.

5.2. MÉTODOS HISTOLÓGICOS

- Bloquear el tejido con suero al 10 % en PBT, usando un suero de la misma especie de la que se haya obtenido el anticuerpo secundario. Introducir las preparaciones en una cámara húmeda, añadir la solución de bloqueo y cubrir con parafilm para que la superficie del porta junto a los tejidos quede totalmente impregnada. Incubar durante 1 hora en la cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Preparar la dilución adecuada del anticuerpo primario en PBT (Cuadro 5.4), añadir a la preparación y cubrir con parafilm. Incubar en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche.
- Lavar 3 veces en PBT, 10 minutos cada una.
- Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena: sumergir las preparaciones en peróxido de hidrógeno al 10 % durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar 2 veces en PBT durante 5 minutos cada lavado.
- Bloqueo de la biotina endógena: tratar las preparaciones durante 15 minutos con una solución de Avidina D en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para ello, se añaden dos gotas de dicha solución por porta y se cubre con parafilm. Enjuagar con PBT y repetir el mismo procedimiento pero esta vez con una solución de biotina.
- Lavar 2 veces en PBT durante 5 minutos cada lavado.
- Aplicación del anticuerpo secundario: añadir a la preparación la IgG conjugada con Biotina diluida en PBT (Cuadro 5.5), cubrir con parafilm e incubar durante 1 hora en la cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Preparar el reactivo ABC (Para 1 ml de solución: 10 μ l de A + 10 μ l de B + 980 μ l de PBT; Vector Laboratories, Burlingame, CA) e incubar 30 minutos a 4 °C en oscuridad.
- Lavar las preparaciones 3 veces en PBT durante 10 minutos en cada lavado.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

- Añadir el reactivo ABC a las preparaciones, cubrirlas con parafilm e incubar 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Lavar 2 veces en PBT durante 10 minutos cada lavado.
- Revelado: aplicar la solución de DAB (1 μl H_2O_2 35% + 50 μl DAB 20 \times + 950 μl PBT) a la preparación, cubriendo con parafilm e incubar durante 3-4 minutos, hasta que aparezca el color. En este momento, se detiene la reacción sumergiendo las preparaciones en H_2O destilada.
- Realizar una contra-tinción con hematoxilina diluida 4 veces durante 40 segundos.
- Deshidratar las muestras usando una serie creciente de alcoholes (EtOH 50%, 70%, y 100%) durante 1 minuto en cada solución.
- Sumergir en xileno durante 1 minuto.
- Aplicar medio de montaje DePeX y colocar un cubreobjetos. Dejar solidificar 30 minutos como mínimo. Estas preparaciones se pueden conservar a temperatura ambiente.

Inmunofluorescencia doble

Este ensayo persigue el mismo objetivo que la inmunohistoquímica, con la diferencia que aquí la señal se obtiene gracias a un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo. Por tanto, tenemos la posibilidad de estudiar el patrón de expresión de varios genes simultáneamente uniendo a cada uno de ellos un anticuerpo secundario con fluoróforo de distinto color.

- Calentar las preparaciones en una estufa a 60 °C para que la parafina se ablande (aproximadamente 20 minutos).
- Desparafinar en 2 lavados de Xileno de 10 minutos cada uno.
- Rehidratar las preparaciones en una serie decreciente de alcoholes (EtOH 100% (2 lavados), 70% y 50%), 5 minutos en cada uno.

5.2. MÉTODOS HISTOLÓGICOS

- Hacer 2 lavados con PBT de 5 minutos cada uno.
- Recuperación de antígeno: transferir las preparaciones a un recipiente que contenga 500 ml de tampón Tris-EDTA pH=9 y calentar en el microondas a 800W durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se restablece el nivel de agua evaporada añadiendo 100 ml de H₂O destilada y se vuelve a calentar a la misma potencia durante otros 10 minutos.
- Dejar enfriar 25-30 minutos a temperatura ambiente
- Lavar las preparaciones dos veces con PBT durante 10 minutos cada uno.
- Bloquear el tejido con suero al 10% en PBT 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 junto a los tejidos quede totalmente impregnada. Incubar durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Preparar la dilución adecuada del anticuerpo primario en PBT (Cuadro 5.4), 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 debe haber sido obtenido de una especie distinta y en su dilución óptima.
- Lavar 3 veces en PBT dejándolas 10 minutos en cada uno.
- Preparar la dilución del anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo diluido en PBT (Cuadro 5.5). También se agrega a la dilución DAPI 1× (4',6-diamino-2-fenilindol) a una concentración 1:100 (se trata de un fluorocromo que se une al DNA y se excita con luz ultravioleta, haciendo visibles los núcleos celulares). Añadir esta solución a la preparación, cubrir con parafilm e incubar 1 hora, a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad y en cámara húmeda. Cada anticuerpo secundario debe unirse específicamente a las inmunoglobulinas de la especie de la que se obtuvo cada

5. MATERIAL Y MÉTODOS

anticuerpo primario y estar marcado con un fluoróforo de distinto color.

- Realizar 3 lavados con PBT en oscuridad de 10 minutos cada uno.
- Añadir 150-200 μl de negro Sudán B al 0.1% para eliminar la autofluorescencia del tejido (Sun *et al.*, 2011). Cubrir la preparación con parafilm, e incubar en cámara húmeda oscura 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las preparaciones dos veces con PBT en oscuridad durante 5 minutos cada una.
- Montar con Vectashield (Vector; ref. H-1000) y conservar a 4 °C en condiciones de oscuridad.
- Observar en un microscopio de fluorescencia.

La observación de las preparaciones y las fotomicrografías tanto de las muestras tratadas mediante inmunohistoquímica (campo claro) como inmunofluorescencia (campo oscuro), 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 imágenes se editaron mediante la herramienta de niveles de color del *software* de edición de imágenes *Gimp* para mejorar el contraste y minimizar señal inespecífica del fondo, que suele ocurrir con mayor frecuencia en las inmunofluorescencias.

5.2. MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Proteína	Fuente del anticuerpo	Dilución de trabajo	Referencia
LAMININA	Conejo	1:100	Sigma,L9393
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
CYP11A1 (P450scc)	Cabra	1:200	Santa Cruz Biotechnology, CA sc-18043
SOX9	Conejo	1:500	Merck Millipore, AB5535
DMRT1	Conejo	1:100	Gift from Sylvania Guioli
α -Actina (ACTA2)	Ratón	1:100	Sigma, A2547
β -Catenina	Ratón	1:100	Sigma, C7082
N-Cadherina	Rata	1:1	Hybridoma bank,
Conexina 43	Conejo	1:10	Santa Cruz Biotechnology, CA sc-9059

Cuadro 5.4: Anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpo	Origen	Dilución de trabajo	Conjugado	Referencia
Anti-conejo (IgG)	Asno	1:200	Alexa fluor 555	Invitrogen, A31572
Anti-cabra (IgG)	Asno	1:200	Alexa fluor 488	Invitrogen, A11055
Anti-ratón (IgG)	Asno	1:200	Alexa fluor 555	Invitrogen, A31570
Anti-conejo (IgG)	Cabra	1:200	Alexa fluor 488	Invitrogen, A11008
Anti-conejo (IgG)	Cabra	1:200	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-rata (IgG)	Cabra	1:200	Alexa fluor 555	Invitrogen, A21434
Anti-cabra (IgG)	Conejo	1:150	Biotinilado	Vector,BA-5000
Anti-conejo (IgG)	Cabra	1:150	Biotinilado	Vector, BA-1000
Anti-raton (IgG)	Asno	1:150	Biotinilado	Vector,BA-2000

Cuadro 5.5: Anticuerpos secundarios empleados.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

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

Se trata de una técnica que nos va a permitir detectar células apoptóticas gracias a la actividad de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal. Esta enzima 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 “In Situ Cell death Detection fluorescein” (Roche; ref. 11684795910).

El protocolo es el siguiente:

- Calentar las preparaciones en una estufa a 60 °C para que la parafina se ablande (aproximadamente 20 minutos).
- Desparafinar en 2 lavados de Xileno de 10 minutos cada uno.
- Rehidratar las preparaciones en una serie decreciente de alcoholes (EtOH 100 % (2 lavados), 70 % y 50 %), 5 minutos en cada uno.
- Hacer 2 lavados con PBT de 5 minutos cada uno.
- Tratamiento con proteinasa K (preparar en H₂O bidestilada):
 - Tris-HCl 1 M pH=7.5
 - EDTA 0.5 M pH=8
 - Tritón 0.1 %
 - Proteinasa K 20 µl/ml
- Incubar durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
- Lavar 3 veces con PBT durante 5 minutos cada una.
- Preparar la reacción de TUNEL: mezclar por pipeteo 45 µl de *label solution* y 5 µl de *enzyme solution* y añadirlo 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 PBT en oscuridad durante 5 minutos cada una.

- Si se desea hacer una detección doble TUNEL-inmunofluorescencia, añadir el anticuerpo primario, dejar incubar toda la noche a 4 °C, y lavar con PBT al día siguiente. Posteriormente se agrega el anticuepro secundario como se ha descrito en el protocolo de inmunofluorescencia (con sus respectivos lavados de PBT).
- Añadir 150 μ l de negro Sudán B al 0.1 %, cubrir la preparación con parafilm e incubar en cámara húmeda 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar 2 veces con PBT en oscuridad durante 5 minutos cada una.
- Añadir DAPI 1 \times (1:100) en PBT y cubrir con parafilm e incubar durante 10 minutos en cámara húmeda y oscuridad.
- Lavar 2 veces con PBT, 5 minutos cada una en oscuridad.
- Montar con Vectashield (Vector; ref. H-1000) y conservar a 4 °C en oscuridad.

Prueba de permeabilidad de la BTB

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

A continuación se describe el protocolo utilizado:

- Anestesiarse los animales con una mezcla de Ketamina (50-100 mg/kg) y Medetomidina (0.5-1 mg/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.
- Hacer una incisión en la zona escrotal para exponer los testículos e inyectar 20 μ l de trazador bajo la túnica albugínea en diferentes puntos de la gónada izquierda usando una aguja hipodérmica. En el testículo derecho, como control, se inyecta la misma cantidad de PBS 1 \times con CaCl₂ 1 mM. Después los testículos se devuelven a su posición natural en el interior del abdomen.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

- Pasados 30 minutos desde la inyección del trazador, sacrificar los animales, aun anestesiados, mediante dislocación cervical y fijar las gónadas en fijador de Serra durante 24 horas.
- Procesar los testículos como se ha descrito en los métodos histológicos, para su inclusión en parafina, cortar secciones de 6 μm y montar las preparaciones.

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

- Calentar las preparaciones en una estufa a 60 °C para que la parafina se ablande (aproximadamente 20 minutos).
- Desparafinar en 2 lavados de Xileno de 10 minutos cada uno.
- Rehidratar las preparaciones en una serie decreciente de alcoholes (EtOH 100 % (2 lavados), 70 % y 50 %), 5 minutos en cada uno.
- Hacer 2 lavados con PBT de 5 minutos cada uno.
- Recuperación de antígeno: transferir las preparaciones a un recipiente que contenga 500 ml de tampón Tris-EDTA pH=9 y calentar en el microondas a 800W durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se restablece el nivel de agua evaporada añadiendo 100 ml de H₂O destilada y se vuelve a calentar a la misma potencia durante otros 10 minutos.
- Dejar enfriar 25-30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las preparaciones dos veces con PBT durante 10 minutos cada una.
- Preparar una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 conjugado con estreptavidina (Invitrogen; ref. S11226). Añadir la solución, cubrir con parafilm e incubar en cámara húmeda, en oscuridad, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- En el caso de hacer una detección doble trazador-inmunofluorescencia, el anticuerpo primario se añade previamente, lavando después con PBT, y el anticuerpo secundario se incorpora junto al anticuerpo conjugado con estreptavidina.
- Lavar 3 veces con PBT en oscuridad durante 10 minutos cada una.
- Añadir 150 μ l de negro Sudán B al 0.1 %, cubrir la preparación con parafilm e incubar en cámara húmeda 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las preparaciones 2 veces con PBT en oscuridad durante 5 minutos cada una.
- Añadir DAPI 1 \times , (1:100) en PBT y cubrir con parafilm e incubar durante 10 minutos en cámara húmeda y oscuridad.
- Hacer 2 lavados con PBT de 5 minutos cada uno en oscuridad.
- Montar con Vectashield (Vector; ref. H-1000) y conservar a 4 °C en condiciones de oscuridad.

5.3 Métodos moleculares

Extracción de RNA total

Para extraer el RNA de las gónadas hemos utilizado el “RNeasy Midi kit” de Qiagen (ref. 75144) y el “RNeasy Micro Kit” del mismo fabricante (ref. 74004). En ambos casos se han seguido las instrucciones proporcionadas por Qiagen con algunas modificaciones. Ambos protocolos son muy similares, la principal 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 instrumental 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.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

- Sacar la muestra (un fragmento de masa testicular) del contenedor de N₂ líquido y mantener en hielo. Actuar con rapidez para evitar la degradación del ARN.
- Transferir el material a un tubo libre de RNasas y añadir 350 μ l de tampón RLT, al que previamente se le añadió β -mercaptoetanol en proporción 1:100.
- Homogeneizar las gónadas por completo pasando la muestra por agujas de diferentes calibres repetidas veces.
- Centrifugar el lisado a máxima velocidad durante 3 minutos. Recoger el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo.
- Añadir 1 volumen de EtOH 70 % al lisado y mezclar bien por pipeteo. No centrifugar y pasar rápidamente al 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 eluido.
- Añadir 350 μ l del tampón RW1 a la columna y centrifugar a 10 000 rpm durante 30 segundos. Descartar el eluido.
- Preparar la solución de DNasa I mezclando 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 μ l del tampón RW1 a la columna y centrifugar a 10 000 rpm durante 30 segundos. Descartar el eluido y el tubo colector.
- Poner la columna en un tubo colector nuevo y añadirle 500 μ l del tampón RPE. Centrifugar durante 30 segundos a 10 000 rpm y descartar el eluido.
- Añadir 500 μ l de EtOH 80 % a la columna y centrifugar durante 2 minutos a 10 000 rpm. Descartar el eluido 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 15-20 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 Nanodrop.
- Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1%, cargando aproximadamente 0.5 μg de RNA y comprobar que existen dos bandas de ribosómico, lo cual indica que el RNA no está degradado.

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 RNA se separaron en base a su tamaño utilizando geles de agarosa al 1% en Tris-acetato-EDTA (TAE) 1 \times y aplicando una corriente de 5 V/cm.

5.4 Otros métodos

5.4.1 Medida de la concentración de testosterona en suero

Extrajimos la sangre mediante punción cardíaca, justo tras el sacrificio de cada animal y seguimos el siguiente protocolo:

- Dejar coagular la sangre a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Centrifugar 20 minutos a 5000 rpm, a temperatura ambiente.
- Recolectar el sobrenadante (suero) y pasar a un criotubo, con cuidado de no remover el sedimento celular.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

- Almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Posteriormente, los niveles de testosterona se midieron por inmunofluorescencia cuantitativa utilizando el kit para testosterona del sistema i-Chroma TM Reader, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.5 Transcriptómica

5.5.1 *Microtus duodecimcostatus*

Para el análisis del transcriptoma de la especie *M. duodecimcostatus* tuvimos que secuenciar en primer lugar el transcriptoma testicular completo. Posteriormente elaboramos un estudio comparativo de la expresión génica entre ambos estados reproductivos, activo e inactivo.

Para realizar este estudio, extrajimos ARN testicular de tres individuos sexualmente activos (capturados en invierno) y tres inactivos (capturados en verano) tal como se describió anteriormente (Tabla 5.2). Tras pasar con éxito el control de calidad, las muestras de ARN se secuenciaron por separado en una plataforma Illumina HiSeq 2000 en las instalaciones del Instituto Max Planck de Genética Molecular en Berlín y la calidad de las lecturas de secuenciación resultantes se evaluó mediante FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). Con los resultados, elaboramos un estudio de expresión diferencial, el cual consta de una serie de pasos:

Ensamblaje del transcriptoma

Se realizó según el Protocolo Oyster River (ORP), un enfoque de ensamblaje múltiple y *kmer* para el ensamblaje de novo del transcriptoma (MacManes, 2018). Para ejecutar el protocolo sacamos el último contenedor docker de macmaneslab/orp en DockerHub. En el ORP, la calidad del transcriptoma ensamblado se evaluó mediante las puntuaciones Detonate y TransRate, así como por BUSCO (Seppey *et al.*, 2019). El 87,09% de las lecturas fueron mapeadas como pares adecuados por BUSCO con una puntuación del 95,7%, por lo que el transcriptoma se puede considerar como de alta calidad.

Anotación del transcriptoma

Se llevó a cabo según la *pipeline* de trinotate (Bryant *et al.*, 2017). Trinotate solo funciona con transcriptomas ensamblados por Trinity porque el script *get_Trinity_gene_to_trans_map.pl* que hace el archivo *get_Trinity_gene_to_trans_map* utiliza expresiones que coinciden con el estilo Trinity de nombrar las transcripciones en el *Trinity.fasta*. La solución que normalmente se recomienda para usar Trinotate con otros ensambladores consiste en renombrar las transcripciones en el archivo multifasta para que coincida con el estilo de Trinity, o bien construir un *gene_to_trans_map* por otros medios. Para simplificar análisis posteriores, hemos de utilizar una nomenclatura personalizada para los nombres de los distintos transcritos, ya que son una mezcla de nombres de diferentes alineadores, por lo que modificamos las expresiones regulares en *get_Trinity_gene_to_trans_map.pl* para que coincidan con nuestros nombres.

Normalización del transcriptoma

Comparamos los transcriptomas testiculares completos de machos activos e inactivos. La principal diferencia entre ambos a nivel celular es la presencia de células de la línea germinal en testículos activos, que se encuentran ausentes en gran medida en los inactivos. Esta diferencia en la composición celular haría que los análisis posteriores se vean afectados, ya que los términos GO (gene ontology) relacionados con las células germinales aparecerían muy sobreexpresados en los testículos activos. Esto ocultaría la expresión diferencial de genes en las células somáticas que se encuentran en ambos estados testiculares, que son las verdaderas responsables de la regulación de la espermatogénesis, principalmente los genes que se expresan en las células de Sertoli. Por lo tanto, para normalizar los datos y hacer que los transcriptomas sean comparables en términos de contenido celular, decidimos eliminar del archivo multiFASTA los transcritos propios de las células germinales. Para identificarlos, utilizamos las firmas celulares descritas previamente en estudios de secuenciación de células individuales (scRNA-seq) (Hermann *et al.*, 2018; Green *et al.*, 2018). Estos estudios se realizaron en ratón, por lo

5. MATERIAL Y MÉTODOS

que todos los genes incluidos en las firmas de células germinales pertenecen a esta especie. Nuestro informe de Trinotate incluye proteínas de múltiples especies que son identificadas por BLASTX y BLASTP en bases de datos de proteínas. Por lo tanto, para identificar los transcritos que debían eliminarse, tuvimos que buscar las proteínas y genes ortólogos de ratón que se correspondían con cada una de nuestras entradas multiFASTA. Utilizamos una estrategia combinada para identificar todos los posibles genes ortólogos de ratón. Para ello buscamos primero las proteínas ortólogas de ratón y luego los genes que las codifican. También lo hicimos identificando en primer lugar el gen que codifica una proteína en una especie y encontrando después el gen ortólogo de ratón. Realizamos consultas a las API de las bases de datos de Uniprot, Ensembl y Ensembl-compara a partir de los ID de las proteínas, los símbolos de los genes, los ID de entrez IDs o Ensembl IDs. El informe Trinotate, que incluye las anotaciones de todos los transcritos en el archivo multiFASTA, tiene un total de 229172 entradas que corresponden a 154507 transcritos únicos y 114617 de ellos fueron relacionados por Trinotate con proteínas de múltiples especies. Esta estrategia combinada permitió identificar los genes ortólogos de ratón de 113914 transcritos. Estas transcripciones se incluyeron en un nuevo archivo FASTA procesado en el que se utilizó el símbolo del gen del ratón y un número de transcripción para renombrar los transcritos. Los transcritos con más de un posible gen ortólogo de ratón se nombraron mediante la concatenación de todos los posibles símbolos de genes de ratón para conservar la mayor cantidad de información posible. De estos nuevos archivos FASTA, eliminamos todos los genes incluidos en los clústeres 1-13 y 16 de ([Hermann et al., 2018](#)), pertenecientes a diferentes tipos de células germinales, y también eliminamos los pertenecientes a espermatogonias, espermatocitos, espermátidas redondas y espermátidas alargadas de ([Green et al., 2018](#)). En definitiva, se descartaron 8282 secuencias transcritas de 7796 genes. El nuevo archivo FASTA depurado contenía 105632 transcritos de 15807 genes. Para evaluar el efecto de este método de normalización, calculamos los coeficientes de correlación entre todos los pares de muestras posibles. Los coeficientes de correlación entre las muestras de la misma categoría deberían ser más altos que los de la categoría diferente. Después de la normalización, esperamos una menor diferencia entre estos coeficientes, ya

que las muestras de diferente categoría deben ser más similares después de eliminar los transcritos de las células germinales. Efectivamente, el coeficiente de correlación medio entre las muestras de diferentes categorías aumentó de 0,5 a 0,7 después de la normalización (Fig. 5.3)

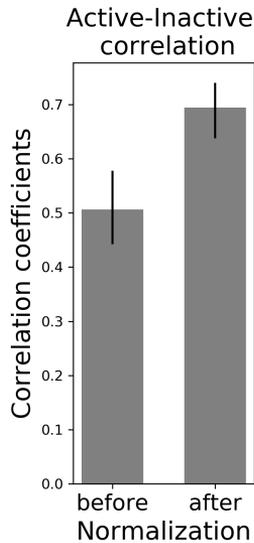


Figura 5.3: Coeficientes de correlación a nivel transcripcional entre ambas muestras. Las barras muestran el coeficiente de correlación medio entre las muestras de testículos activos e inactivos. Los extremos de las líneas verticales indican los coeficientes de correlación máximo y mínimo.

Cuantificación de los transcritos

Para cuantificar la abundancia de cada transcrito en los transcriptomas, utilizamos Trinity con el transcriptoma ensamblado de ORP como referencia (Haas *et al.*, 2013; Grabherr *et al.*, 2011)). Para ejecutar este pipeline con nuestra nomenclatura de transcripción, utilizamos el archivo *get_Trinity_gene_to_trans_map.pl*, como se describió anteriormente, y modificamos las expresiones regulares en *TrinityStats.pl* para aceptar notaciones que no fueran de Trinity. También comprobamos la calidad del

5. MATERIAL Y MÉTODOS

transcriptoma como se indica en la documentación del software. Los datos estadísticos basados en todos los *contigs* de transcripción fueron los siguientes:

```
Contig N10: 6366
Contig N20: 4737
Contig N30: 3736
Contig N40: 2953
Contig N50: 2322
```

```
Median contig length: 710
Average contig: 1306.27
Total assembled bases: 137983859
```

y basándonos sólo en la isoforma más larga por gen:

```
Contig N10: 8068
Contig N20: 6404
Contig N30: 5421
Contig N40: 4678
Contig N50: 4022
```

```
Median contig length: 2484
Average contig: 2950.40
Total assembled bases: 46636968
```

Ambos resultados estadísticos mostraron una elevada longitud de contig. Como alternativa más adecuada, el estadístico N50 puede limitarse a los genes más expresados que representan un alto porcentaje del total de los datos normalizados. El trazado del valor Ex frente al valor ExN50 mostró un máximo cercano a N85. La estadística Ex85N50 muestra que 31028 genes tienen una longitud de transcripción de aproximadamente 3,2kb, lo que apoya la alta calidad del transcriptoma. Cada muestra se alineó con este transcriptoma de referencia con RSEM ([Li y Dewey, 2011](#)). También realizamos una comprobación de la calidad de las muestras

según la documentación de Trinity. Las muestras pertenecientes a la misma categoría (sexualmente activas o inactivas) mostraron una alta correlación (90 %) tanto a nivel de genes como a nivel de transcripción. Las muestras de diferente categoría mostraron una correlación del 60 % entre las muestras a nivel de genes, y 70 % a nivel de transcripción. Los análisis de componentes principales mostraron que la variable principal (activo frente a inactivo) explica el 85,13 % de la variabilidad a nivel de genes, y el 78,17 % a nivel de transcripción.

Analisis de expresión diferencial

Se realizaron con Trinity/RSEM según las instrucciones en la documentación de Trinity. Los genes se consideraron como expresados diferencialmente a $P < 0,001$ y $\log FC > 2$.

5.5.2 *Talpa occidentalis*

Para el análisis del transcriptoma de la especie *T. occidentalis* se extrajo ARN testicular de seis testículos de topo, 2 de machos activos (enero), otros 2 de machos inactivos (julio) y 2 de machos en proceso de regresión testicular (abril) (Tabla 5.3), tal y como hemos descrito anteriormente.

RNA-seq

Tras pasar con éxito el control de calidad, las muestras de ARN se secuenciaron por separado en una plataforma Illumina HiSeq 2000 en las instalaciones del Instituto Max Planck de Genética Molecular en Berlín, Alemania.

Bioinformática

La calidad de las lecturas de secuenciación resultantes se evaluó utilizando FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas de RNA-seq fueron mapeadas al genoma de *T. occidentalis*

5. MATERIAL Y MÉTODOS

recientemente publicado (M Real *et al.*, 2020) con la función “align” y “featureCounts” del paquete R subread (Liao *et al.*, 2019). Al igual que ocurre con *M. duodecimcostatus*, la mayoría de los tipos de células germinales meióticas y postmeióticas (desde el espermatocito primario hasta el espermatozoide) son exclusivos de los testículos activos, estando completamente ausentes en los inactivos.

Así, muchos genes expresados en las células germinales aparecerán como falsamente sobre-expresados en los testículos sexualmente activos, no obstante, estos resultados no reflejarán cambios en la expresión génica, sino diferencias en el contenido celular entre los testículos activos e inactivos. Esta sobrerrepresentación de los transcritos específicos de las células germinales en los testículos activos enmascarará los cambios en la expresión génica de las células somáticas, que sí ejercen el control del ciclo espermatogénico, en particular las células de Sertoli. Por ello, para normalizar los datos y centrarnos en el estudio de la expresión génica en las células somáticas, decidimos eliminar los transcritos expresados en las células germinales del archivo General Feature Format (GFF) del topo ibérico que hemos generado recientemente (M Real *et al.*, 2020). Para ello, usamos la misma estrategia que hemos descrito en esta sección para *M. duodecimcostatus*. Después de hacer esto, el número de genes analizados disminuyó de 13474 (Tabla Suplementaria *T. occidentalis* S1) a 8300 (Tabla Suplementaria *T. occidentalis* S3). El análisis de la expresión génica diferencial se realizó con edgeR (Robinson *et al.*, 2010). Los genes se filtraron por niveles de expresión con la función “filterByExpr” de edgeR, y el número total de lecturas por muestra se normalizó con la función “calcNormFactors” de edgeR. Se consideró que los genes se expresaban de forma diferencial con un $\text{P}_{\text{adjust}} < 0,05$ y un $|\log_2\text{FC}| > 1$. El análisis de ontología genética se realizó con la función “enrichGO” del paquete clusterProfiler (Yu *et al.*, 2012). Los términos generales y los términos no relacionados con las funciones testiculares no se mostraron. Para la visualización, se utilizó la función barplot del mismo paquete. Para el análisis de conceptos de genes, se utilizó la función “cnetplot” del paquete clusterProfiler.

5.6 Soluciones

Fijador de Serra

- 60 % de Etanol 96 %.
- 30 % de Formaldehído 37 %.
- 10 % de Ácido acético glacial.

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.
- Ajustar el pH a 7.4
- Autoclavar

PBT 1× Tween20 al 0.1 % en PBS 1×

Tampón Tris-EDTA pH=9 (para preparar 500 ml)

- Disolver los siguientes componentes en 400 ml de H₂O bidestilada:
 - 2.2 g de tris-base
 - 0.86 g de EDTA
 - 200 μl de Tween20 al 50 %
- Añadir H₂O bidestilada hasta 500 ml y disolver con ayuda de un agitador.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

negro Sudán B 0.1 % (para preparar 10 ml)

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

DAPI 100×

- Añadir 2 μl 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, manteniéndolo en oscuridad y a 4 °C.

Hematoxilina

- Disolver 2 g de hematoxilina (Sigma; ref. H3136-25G) en 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.

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.

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
- Añadir H₂O bidestilada hasta un volumen de 200 ml.
- Autoclavar

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 con NaOH 10 N
- Ajustar el volumen a 100 ml.
- Autoclavar

TAE 50× (para preparar un volumen de 1 l)

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

5. MATERIAL Y MÉTODOS

6. Resultados

6.1 *Hemiechinus auritus*

6.1.1 Los testículos de *Hemiechinus auritus* permanecen estériles durante el invierno

Como hemos mencionado en la sección de Introducción, el erizo orejado es un reproductor estacional que, independientemente de su localización, cría a finales de la primavera y durante el verano, mientras que en otoño e invierno permanece inactivo (Schoenfeld y Yom-Tov, 1985; Flower, 1932; Prakash, 1960; Goyal y Mathur, 1974; Asawa y Mathur, 1982). De acuerdo con esto, los individuos capturados en este estudio en verano eran significativamente más grandes que los de invierno (masa corporal de verano: 225 ± 24 g; masa corporal de invierno: 192 ± 10 g; prueba *t*-student de dos colas, $P = 0,019$; Figura 6.1 A). En el grupo de verano, la masa testicular media fue tres veces superior a la del grupo de invierno (masa testicular de verano: 887 ± 88 g; masa testicular de invierno: 277 ± 40 g; prueba *t*-student de dos colas, $P < 0,001$; (Figura 6.1 B). A nivel histológico, los testículos del grupo de verano presentaban todas las características de un testículo activo y fértil, con túbulos seminíferos en todas las fases del ciclo espermatogénico y espermiogénesis completa (Figura 6.2 A). En consecuencia, encontramos abundantes espermatozoides en los epidídimos (6.2 B). En cambio, los testículos de invierno mostraron una marcada reducción de los túbulos seminíferos (diámetro tubular de verano: $195 \pm 18 \mu\text{m}$; diámetro tubular de invierno: $80 \pm 11 \mu\text{m}$; prueba *t*-student de dos colas, $P < 0,001$; (Figuras 6.1 C y 6.2 C). En estos túbulos no se pudo identificar ninguna etapa del ciclo espermatogénico y la mayoría de ellos estaban llenos de espermatoцитos primarios, careciendo de espermatoцитos secundarios,

6. RESULTADOS

espermáticas y espermatozoides (Figura 6.2 C). En consecuencia, el epidídimo estaba reducido y completamente vacío (Figura 6.2 D)(Tabla suplementaria *H. auritus* S1)

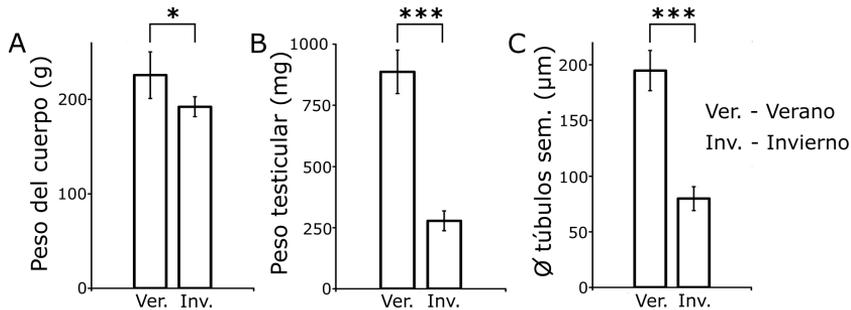


Figura 6.1: Comparación de tres parámetros morfométricos entre los grupos de verano e invierno de *H. auritus*. (A) masa corporal, (B) masa testicular y (C) diámetro de los túbulos seminíferos.

6.1.2 La espermatogénesis se interrumpe en paquitene en los testículos inactivos de *Hemiechinus auritus*

Mediante inmunofluorescencia estudiamos el patrón de expresión de marcadores moleculares específicos de células somáticas en testículos de erizos orejados capturados en verano (los cuales en adelante denominaremos activos) y en invierno (que denominaremos inactivos). SOX9 es un factor de transcripción necesario para el mantenimiento y función de las células de Sertoli adultas (Barrionuevo *et al.*, 2016). En los testículos activos las células positivas para SOX9 estaban distribuidas uniformemente en la parte basal de los túbulos seminíferos (Figura 6.3 a). En los testículos inactivos, las células positivas para SOX9 también se localizaban en la periferia de los túbulos testiculares, en cambio, la distancia entre las células positivas adyacentes estaba notablemente reducida en comparación con la de los testículos activos (Figura 6.3 e). Esto sugiere que las células de Sertoli en los testículos inactivos sufren una fuerte contracción. También estudiamos dos marcadores que se expresan en la periferia de los túbulos: 1) α -actina (ACTA2), que es un marcador de las células mioideas peritubulares y de las fibras musculares arteriales en testículo (Palombi *et al.*, 1992) y 2) lami-

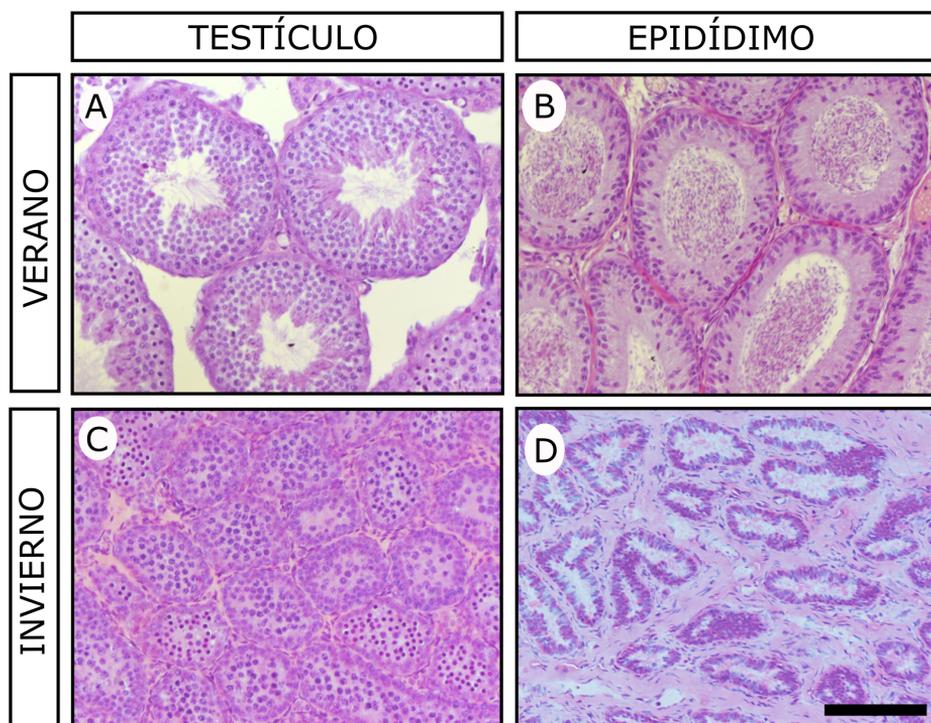


Figura 6.2: Histología de los testículos y los epidídimos de erizos orejados capturados en invierno y verano. Tinción hematoxilina-eosina de secciones de testículos (A y C) y epidídimos (B y D), pertenecientes a individuos capturados en verano (A y B) e invierno (C y D). La barra de escala mostrada en D representa 100 μm para todas las imágenes.

6. RESULTADOS

nina (LAM), un componente presente en la membrana basal (Richardson *et al.*, 1995). En los testículos activos encontramos una intensa expresión de ACTA2 y LAM rodeando a los túbulos seminíferos de forma continua (Figura 6.3 b y c). Sin embargo, en los testículos inactivos, la señal de ACTA2 y LAM era más débil y se observaba de forma discontinua alrededor de los túbulos. Esto probablemente también es consecuencia de la involución de los túbulos seminíferos (Figura 6.3 f y g). También estudiamos la expresión de la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450scc), una proteína implicada en la síntesis de testosterona que es un marcador de las células intersticiales esteroidogénicas, las células de Leydig. Observamos que tanto en los testículos activos como en los inactivos la expresión de P450scc era visible en las células de Leydig, indicando que en los testículos inactivos la función esteroidogénica está activa, al menos hasta ciertos niveles (6.3 d y h).

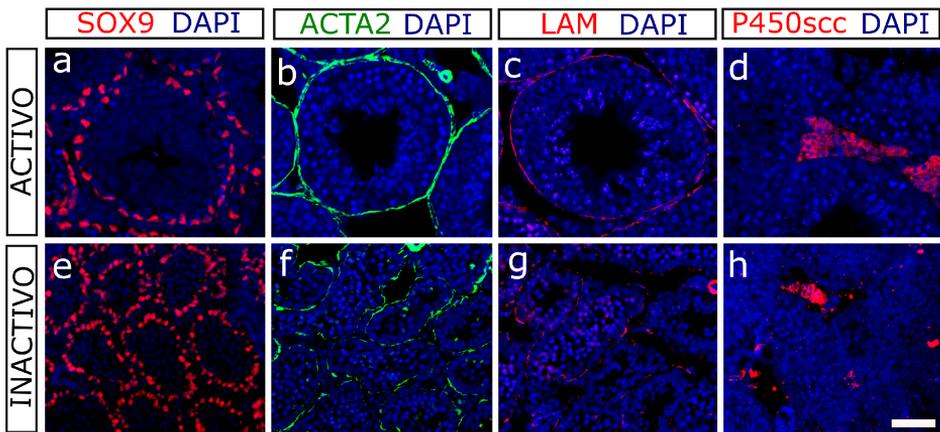


Figura 6.3: Estudio de marcadores moleculares de células somáticas en testículos de *H. auritus*. Inmunofluorescencia para SOX9 (a, e), ACTA2 (b, f), LAM (c, g) y P450scc (d, h) en testículos activos (a-d) e inactivos (e-h). La barra de escala mostrada en h representa 50 μm .

También analizamos el patrón de expresión de marcadores específicos de células germinales. Para ello, estudiamos la expresión de DMC1, un marcador de espermatoцитos primarios en leptotene, cigotene y paquitene temprana (Yoshida *et al.*, 1998), y del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), que se expresa tanto en las espermatogonias, como

en espermatoцитos primarios en cigotene y paquitene, pero no en leptotene (Chapman y Wolgemuth, 1994). Los testículos activos presentaban células positivas tanto para DMC1 como PCNA (Figura 6.4 a-c), localizándose la señal en la periferia de los túbulos seminíferos. Ambas proteínas mostraban un patrón de expresión que variaba en función de la fase del ciclo espermatogénico, como se ha descrito previamente (Dadhich *et al.*, 2011; Massoud *et al.*, 2014). Así, las células positivas para DMC1 sólo se observaron en los túbulos seminíferos que estaban en los estadios espermatogénicos VII-IX, los cuales contenían espermatoцитos en leptotene, cigotene y paquitene temprana (estrellas en la Figura 6.4 a). Por su parte, PCNA se encontró en espermatogonias en mitosis así como en espermatoцитos en fase de cigotene y paquitene (Figura 6.4 b). Ambas proteínas coexpresan en los espermatoцитos en cigotene y paquitene tempranos de los túbulos seminíferos en los estadios VII-IX (estrellas en la Figura 6.4 c), pero no en los túbulos seminíferos que contienen espermatoцитos en paquitene más tardíos (asteriscos en la Figura 6.4 c). En el testículo inactivo ambos marcadores mostraron un patrón de expresión similar al de los testículos activos, aunque la señal de las células positivas no presentaban una organización circular y aparecían de forma agrupada (Figura 6.4 d-f). A mayor aumento observamos que el lumen de los túbulos seminíferos estaba completamente lleno de espermatoцитos que, o bien eran positivos para DMC1 y PCNA (cigotene y paquitene temprana), o bien eran negativos para DMC1 y positivos para PCNA (paquitene tardía) (Figura 6.5 b-d). En conjunto, nuestros resultados muestran que en los testículos inactivos de *H. auritus* las espermatogonias continúan proliferando y entrando en meiosis, aunque se detienen posteriormente en el estadio de paquitene.

6.1.3 Los espermatoцитos primarios sufren apoptosis en el testículo inactivo de *Hemiechinus auritus*

La apoptosis es un proceso que ocurre normalmente en los testículos regresionados de muchos mamíferos con reproducción estacional (Young y Nelson, 2001), por ello decidimos aplicar la técnica TUNEL en cortes histológicos de los testículos activos e inactivos de *H. auritus* (Figura 6.6). Los testículos activos sólo contenían algunas células positivas en un

6. RESULTADOS

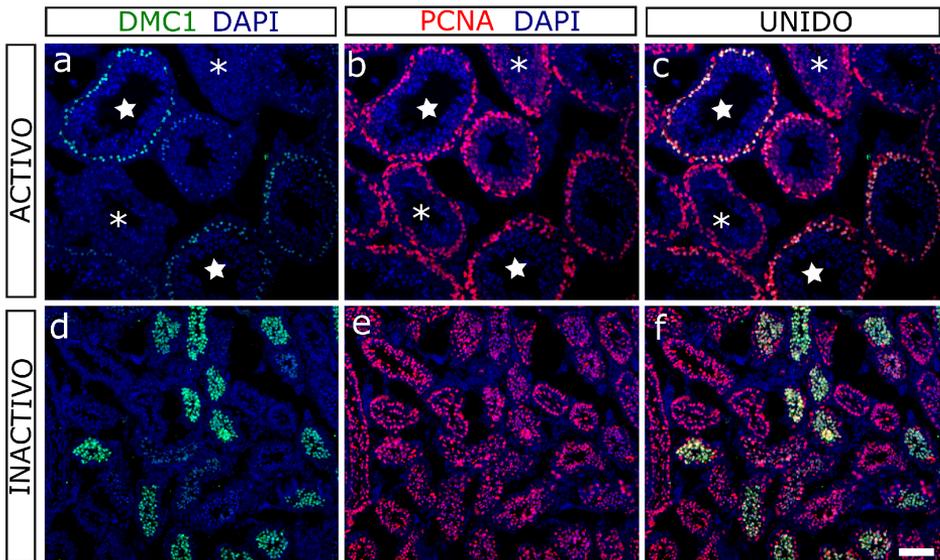


Figura 6.4: Estudio de marcadores moleculares de células germinales en testículos de *H. auritus*. Doble inmunofluorescencia para DMC1 (verde) y PCNA (rojo) en testículos activos (a-c) e inactivos (d-f). Las estrellas marcan túbulos seminíferos que contienen células positivas para DMC1 y los asteriscos marcan los túbulos que carecen de ellas. La barra de escala mostrada en **f** representa 100 μm .

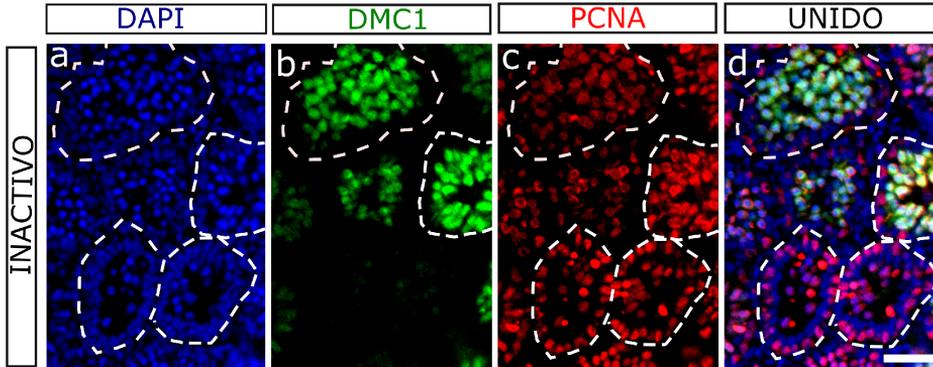


Figura 6.5: Micrografías a mayor aumento de la doble inmunofluorescencia para DMC1 y PCNA en testículos inactivos (Figura 6.4). Tinción con DAPI (a, azul), DMC1 (b, verde), PCNA (c, rojo) y todos los canales mezclados (d). La barra de escala mostrada en d representa $50\ \mu\text{m}$ para todas las micrografías.

número reducido de túbulos seminíferos, mientras que el número de células apoptóticas era notablemente mayor en los testículos inactivos (activos: 17 ± 4 células apoptóticas por 100 secciones tubulares; inactivos 334 ± 54 células apoptóticas por 100 secciones tubulares; prueba *t*-student de dos colas, $P = 0,0094$; Figura 6.7)

Para identificar los tipos de células que sufren apoptosis en los testículos inactivos de *H. auritus* combinamos la técnica TUNEL junto con la inmunofluorescencia usando bien un marcador de células de Sertoli, SOX9, o bien un marcador de células germinales, PCNA. Observamos que las células positivas para SOX9 nunca eran positivas para TUNEL (Figura 6.8 a-c), lo que indica que las células de Sertoli no estaban muriendo. Por el contrario, todas las células apoptóticas mostraron inmunoreactividad para PCNA (células amarillas en la Figura 6.8 f), mostrando que en los testículos inactivos de *H. auritus* se produce una pérdida masiva de células germinales por apoptosis.

6. RESULTADOS

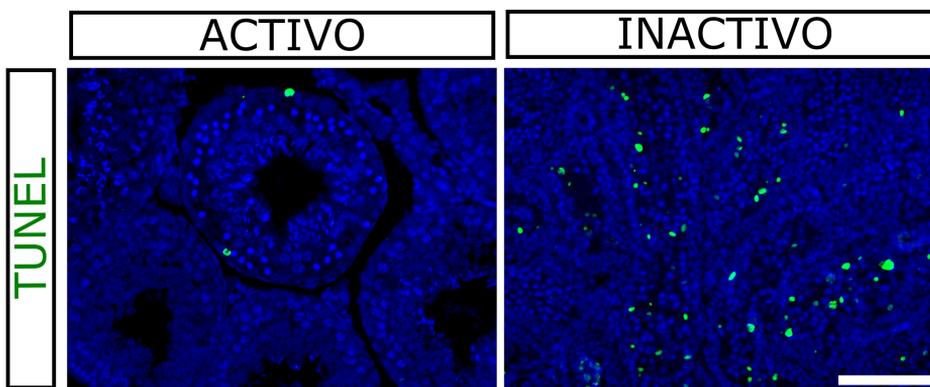


Figura 6.6: Estudio de la apoptosis en testículos activos e inactivos de *H. auritus* Ensayo TUNEL en un corte histológico de testículo activo (a) e inactivos (b) de *H. auritus*. Los núcleos se han teñido con DAPI. La barra de escala en b representa 100 μm en a y b.

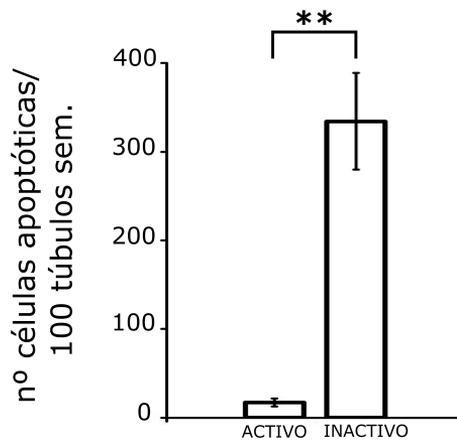


Figura 6.7: Cuantificación de la apoptosis en testículos activos e inactivos.

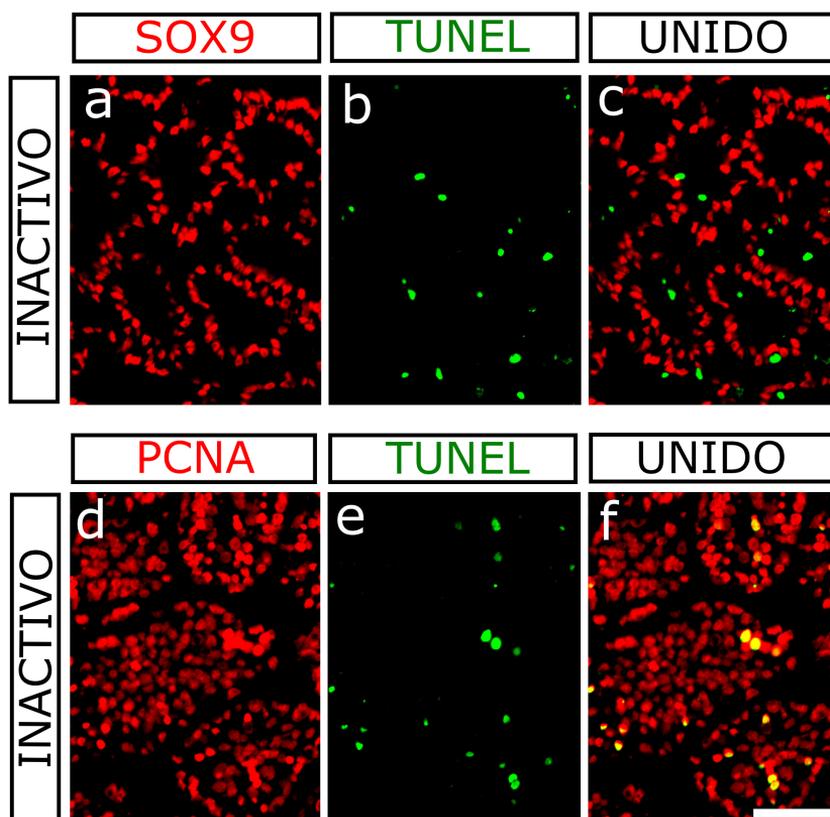


Figura 6.8: Identificación de células apoptóticas en testículos inactivos de *H. auritus*. Doble tinción TUNEL-SOX9 (a-c) y TUNEL-PCNA (d-f) en testículos inactivos de *H. auritus*. La barra de escala en f representa 50 μm para todas las micrografías.

6. RESULTADOS

6.1.4 Las células germinales se eliminan mediante descamación durante la regresión testicular de *Hemiechinus auritus*

Dos individuos capturados a principios de otoño (finales de septiembre) presentaban testículos en los que se estaba produciendo el proceso de regresión (en adelante, en inactivación). En estos testículos, el diámetro medio de los túbulos seminíferos se situaba entre los del grupo de verano y el de invierno ($120 \pm 12 \mu\text{m}$). El epitelio germinativo tenía un aspecto desorganizado en muchos túbulos y se encontraron espermatoцитos primarios y secundarios de forma anómala en el lumen (recuadro en Figura 6.9 a), indicando que se habían desprendido de su ubicación habitual en regiones más basales. También detectamos este tipo de células germinales dentro del lumen del epidídimo (Figura 6.9 b).

Para comprobar si la apoptosis era responsable de la pérdida masiva de células germinales que tiene lugar en los testículos en inactivación del erizo orejudo realizamos el ensayo TUNEL. Se observaron células apoptóticas dentro de los túbulos seminíferos de los testículos en inactivación, aunque pocas de ellas estaban localizadas en el lumen o en sus proximidades (Figura 6.10), lo que indica que la descamación afecta principalmente a las células vivas. Estos resultados sugieren que, aunque la apoptosis puede contribuir en cierta medida a la depleción masiva de células germinales que afecta a los testículos en inactivación, otros mecanismos adicionales deben estar implicados en el proceso.

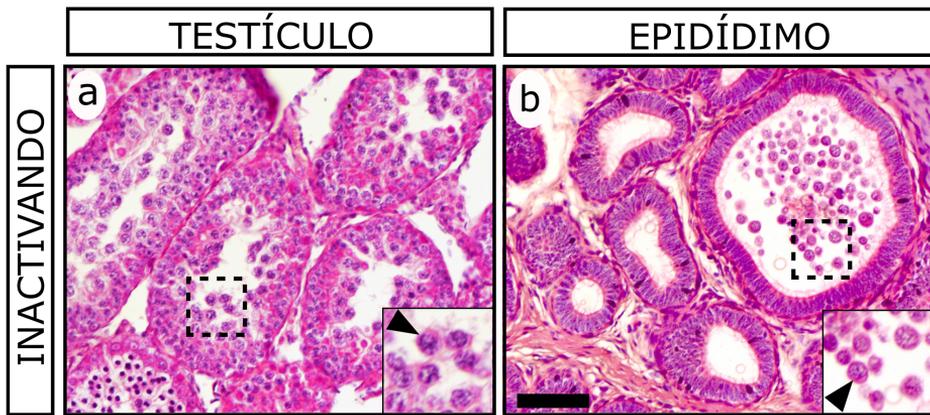


Figura 6.9: Descamación de las células germinales en el testículo en regresión. Tinción de hematoxilina y eosina de testículo (a) y epidídimo (b) de un testículo en regresión. Durante la regresión testicular, los túbulos seminíferos muestran un epitelio germinativo desorganizado, con espermatocitos primarios y secundarios ocupando el lumen (punta de flecha en el recuadro en a). Estos espermatocitos primarios también están presentes en algunas secciones del epidídimo (punta de flecha en el recuadro b). La barra de escala mostrada en b representa 75 μm en a y b.

6. RESULTADOS

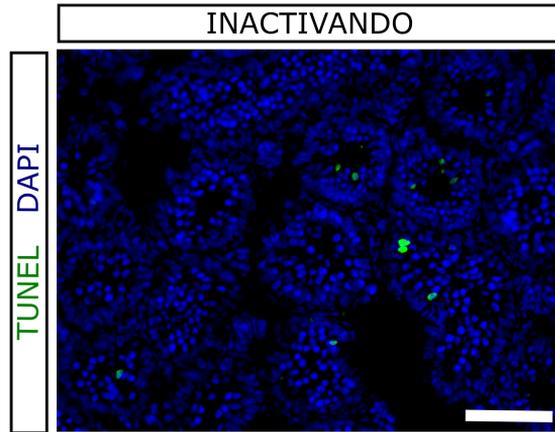


Figura 6.10: Ensayo TUNEL en un testículo en proceso de inactivación.

Nótese la presencia de varias células apoptóticas (fluorescencia verde) situadas en los túbulos seminíferos. Los núcleos se han teñido con DAPI. La barra de escala mostrada representa 75 μm .

Dos estudios recientes han demostrado que en los testículos de dos reproductores estacionales, el topo ibérico *T. occidentalis* (Dadhich *et al.*, 2013) y el gran armadillo peludo *C. villosus* (Luaces *et al.*, 2014), la pérdida de las uniones entre las células de Sertoli y las células germinales conduce a una rápida descamación de las células germinales durante el periodo de regresión testicular. Para determinar si la expresión de las proteínas que forman las uniones entre las células de Sertoli y entre las células de Sertoli y las células germinales estaba alterada en los testículos en inactivación de *H. auritus*, realizamos inmunofluorescencia para las siguientes moléculas de adhesión celular en secciones histológicas de testículos activos, en inactivación e inactivos:

- N-cadherina (NCAD) y β -catenina (β -CAT): son componentes estructurales de las uniones adherentes, así como de la especialización ectoplásmica existente entre las uniones entre las células de Sertoli y entre las células de Sertoli y las células germinales (Mruk y Cheng, 2004).
- Claudina 11 (CLDN11): es una proteína transmembrana de las uniones estrechas que forman la BTB (Gow *et al.*, 1999).

- Conexina 43 (CNX43): es un componente de las uniones GAP que se encuentran en las zonas de contacto entre las células de Sertoli y entre las células de Sertoli y las células germinales (Batias *et al.*, 1999).

La expresión de NCAD Y β CAT en los testículos activos era más fuerte en el compartimento basal que en la región adluminal (Figura 6.11 a, d) y la expresión de CLDN11 Y CNX43 se encontraron localizadas principalmente en el compartimento basal del epitelio germinativo (Figura 6.11 g, j). Por el contrario, tanto en los testículos que están en inactivación como en los inactivos, se observó una desorganización generalizada para las cuatro moléculas en todo el epitelio germinativo (Figura 6.11 b, c, e, f, h, i, k y l).

Estos resultados sugieren que la adhesión entre las células de Sertoli y entre las células de Sertoli y las células germinales está comprometida en los testículos en regresión, explicando así el desprendimiento de células germinales que tiene lugar durante este periodo.

6.1.5 Los niveles de testosterona sérica de *Hemiechinus auritus* están reducidos durante la temporada no reproductiva

La reducción de los niveles de testosterona sérica en los machos durante la época no reproductiva es una característica común a todos los mamíferos con reproducción estacional estudiados hasta la fecha. En el caso de *H. auritus*, los niveles medios de testosterona sérica se redujeron significativamente en los individuos capturados en invierno en comparación con los del grupo de verano (verano: $15,8 \pm 3,11$ ng/ml; invierno $0,9 \pm 0,21$ ng/ml; prueba t-student de dos colas, $P < 0,001$; Figura 6.12)

6. RESULTADOS

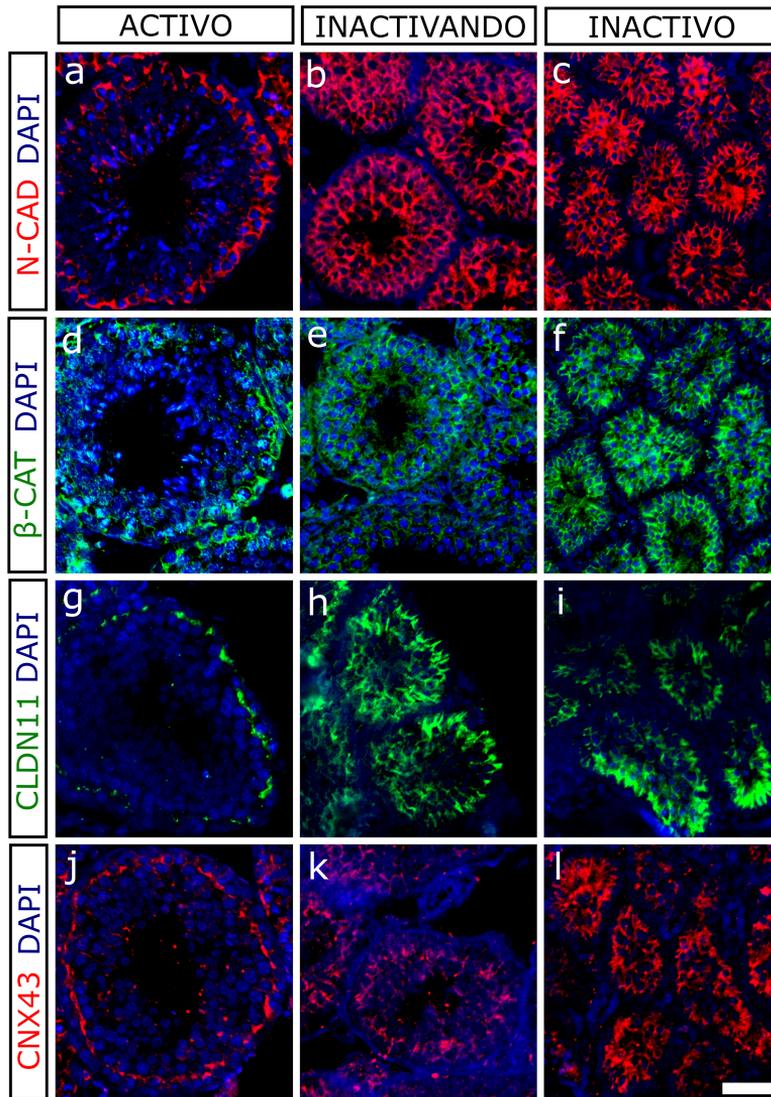


Figura 6.11: Patrón de expresión de varias moléculas de adhesión celular en el epitelio germinativo de testículos activos, en inactivación e inactivos de *H. auritus*. Inmunofluorescencia para N-CAD (a-c), β -CAT (d-f) CLDN11 (g-i) y CNX43 (j-l) en testículos activos (a, d, g, j), en inactivación (b, e, h, k) e inactivos (c, f, i, l) de *H. auritus*. Los núcleos se han teñido con DAPI. La barra de escala en l representa 50 μ m para todas las micrografías

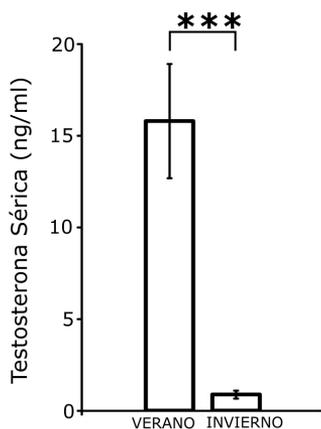


Figura 6.12: Concentración de testosterona sérica en individuos de *H. auritus* capturados en la época activa (verano) e inactiva (invierno).

6.2 *Microtus duodecimcostatus*

6.2.1 Expresión diferencial entre testículos activos e inactivos de *Microtus duodecimcostatus*

Como hemos indicado en la sección de Introducción, nosotros hemos estudiado el ciclo reproductivo de *M. duodecimcostatus* a nivel histológico, inmunohistológico y hormonal (Lao-Pérez *et al.*, 2021). Tras este trabajo nos propusimos estudiar los cambios que ocurren a nivel transcriptómico entre los testículos activos e inactivos de esta especie. Para realizar el estudio de expresión diferencial, realizamos *RNA-seq* en tres testículos activos y tres inactivos de machos capturados en páramos, un hábitat donde esta especie presenta un patrón reproductivo estacional. Como hemos descrito anteriormente, en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus* la espermatogénesis está interrumpida a nivel de espermatogonia (Figuras 6.13 y 6.14) (Lao-Pérez *et al.*, 2021). Por lo tanto, tal como se indicó anteriormente en la sección de Material y Métodos, en testículos activos encontraríamos un mayor nivel de expresión de genes propios de células meióticas y postmeióticas, que no están presentes en los testículos inactivos. El análisis de estos genes no reflejaría ningún cambio fisiológico, sino más bien diferencias entre ambas condiciones en el contenido celular. Esta

6. RESULTADOS

sobre-representación de marcadores específicos de las células germinales en los testículos activos enmascararía la expresión génica diferencial producida en las células somáticas, que son las responsables de la regulación de la espermatogénesis, en particular la de las células de Sertoli. Por ello, decidimos excluir de nuestro análisis transcriptómico una serie de genes conocidos cuya expresión es específica de las células germinales.

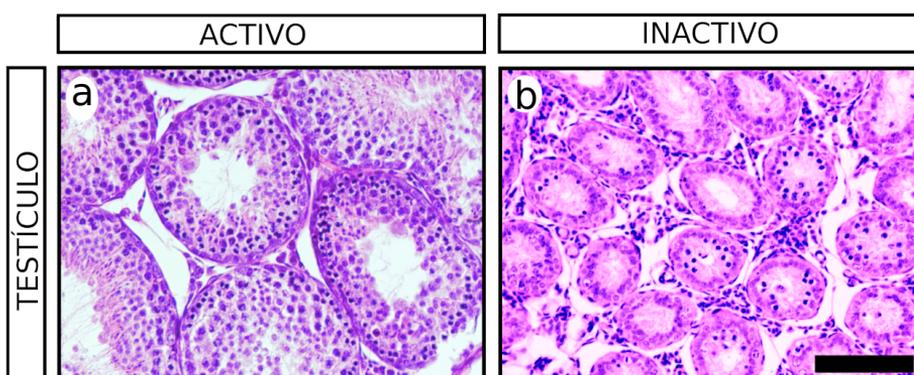


Figura 6.13: Histología de los testículos activos e inactivos de *M. duodecimcostatus*. Secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina de un testículo activo (a) y otro inactivo (b) de *M. duodecimcostatus*. Nótese que el interior de los túbulos seminíferos del testículo inactivo no se observan espermátidas ni espermatozoides maduros. La barra de escala mostrada en b representa 100 μm para a y b.

Al excluir estos marcadores, el coeficiente de correlación medio entre las muestras de los diferentes estados testiculares aumentó de 0,5 a 0,7 después de la normalización (Figura 5.3 en el apartado de Material y Métodos), lo que confirma que nuestro enfoque eliminó buena parte de las diferencias derivadas del distinto contenido celular de los testículos activos e inactivos. Tras el análisis, encontramos 3809 genes expresados diferencialmente (DEGs), de los cuales 2623 estaban sobreexpresados en testículos activos (Act-up-DEG) y 1186 estaban sobreexpresados en testículos inactivos (Inact-up-DEG) ($\text{FDR} < 0,001$ y $|\log_2\text{FC}| > 2$; Figura 6.15);(Tabla suplementaria *M. duodecimcostatus* S1).

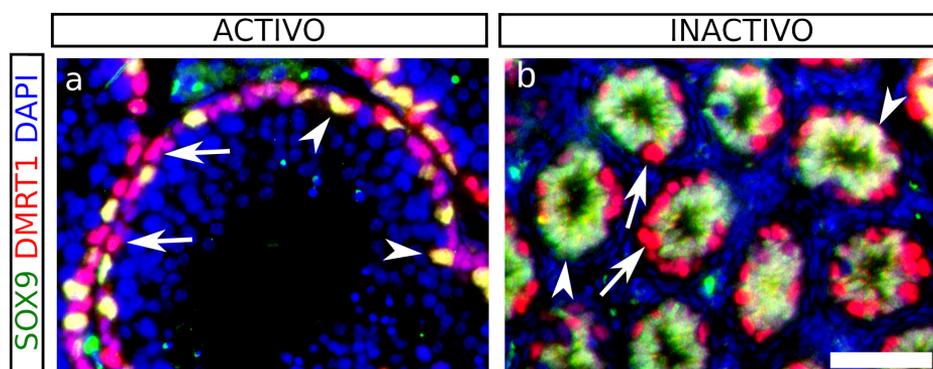


Figura 6.14: La espermatogénesis está interrumpida en el estadio de espermatogonia en testículos inactivos de *M. duodecimcostatus*. Inmunofluorescencia para SOX9, un marcador de células de Sertoli, y DMRT1, marcador de células de Sertoli y espermatogonias. En los testículos activos (a) DMRT1 se expresa en las espermatogonias (flechas) y en las células de Sertoli (cabezas de flecha), donde se colocaliza con SOX9. Obsérvese que, en el interior de los túbulos, hay muchas células negativas para SOX9 y DMRT1, que corresponden a células germinales en fases más avanzadas del ciclo espermatogénico. En el testículo inactivo (b), se observan células de Sertoli (positivas para SOX9 y DMRT1) que llenan toda la parte interna de los túbulos (cabezas de flecha), y también se observan espermatogonias (negativas para SOX9 y positivas para DMRT1) situadas en posiciones basales (flechas) (b). No se observan células negativas para SOX9 y DMRT1 en el interior de los túbulos (b). La barra de escala mostrada en b representa 50 μm para a y b.

6. RESULTADOS

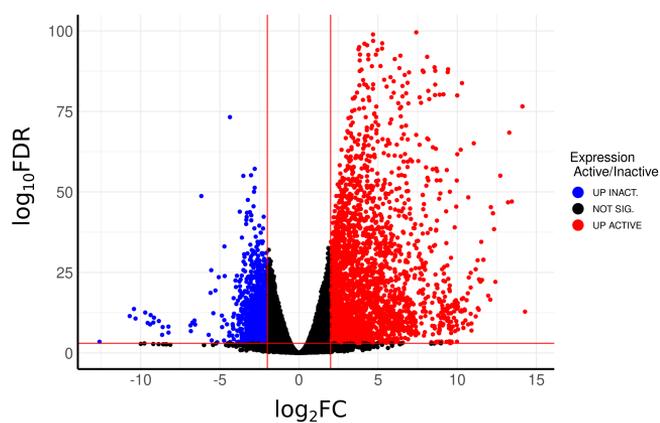


Figura 6.15: Diagrama de la prueba de expresión diferencial Diagrama de dispersión tipo “volcano plot” mostrando genes con expresión diferencial entre testículos activos e inactivos de *M. duodecimcostatus*. La magnitud del cambio viene indicada en el eje de abscisas mediante el \log_2FC entre ambas condiciones. En el eje de ordenadas se representa el nivel de significación estadística mediante el $-\log_{10}(FDR)$. El color rojo indica sobreexpresión en los testículos activos y el color azul sobreexpresión en los testículos inactivos.

6.2.2 Rutas moleculares que controlan la adhesión celular en el epitelio germinativo están alteradas en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus*

El análisis de ontología génica (GO) de los DEGs mostró un enriquecimiento significativo ($p.adjust < 0,05$) en una serie de categorías, muchas de las cuales están estrechamente relacionadas, asociadas a diferentes funciones biológicas (Figura 6.16;(Tabla suplementaria *M. duodecimcostatus* S2)

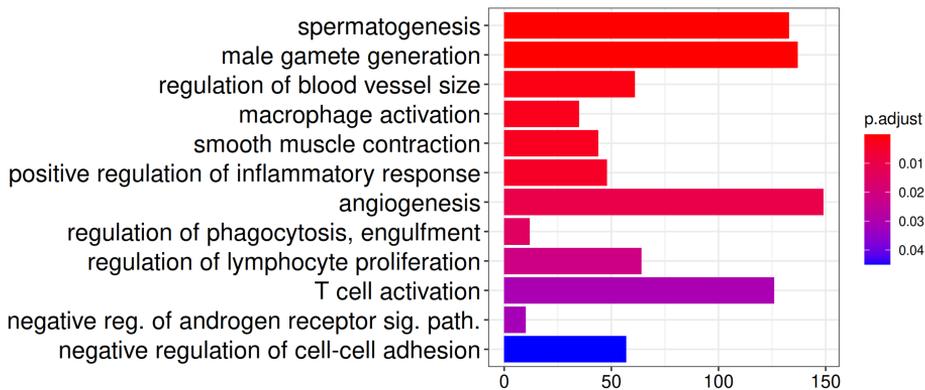


Figura 6.16: Análisis de ontología génica de los genes desregulados.

Podemos observar un enriquecimiento significativo ($p.adjust < 0,05$) en términos asociados con las funciones testiculares normales

Dentro de estas funciones biológicas enriquecidas, encontramos entre las más significativas varias categorías implicadas en la formación de los gametos (Figura 6.16) como la “espermatogénesis” (GO:0007283; $p.adjust = 1,41 \times 10^{-5}$) y la “diferenciación de los gametos masculinos” (GO:0048232; $p.adjust = 1,19 \times 10^{-5}$;(Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S2). Estas categorías estaban enriquecidas también en el análisis GO de Act-up-DEG (Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S3), pero no en el de Inact-up-DEG (Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S4). El hecho de que encontremos este tipo de términos GO a pesar de que hemos eliminado un gran número de marcadores moleculares se debe a 2 razones

6. RESULTADOS

principales: a) que a pesar de nuestra normalización, todavía hay muchos genes expresando en las células germinales meióticas y postmeióticas que no fueron excluidos como genes específicos de las células germinales y b) muchos de estos genes corresponden a marcadores moleculares de las células somáticas que intervienen en la regulación de la meiosis, como *Sox9*, *Sox8*, *Gata4* y *Wt1* Figura 6.17; (Tablas Suplementarias *M. duodecimcostatus* S1-4).

Además, también encontramos términos GO implicados en la “regulación del tamaño de los vasos sanguíneos” (GO:0050880; p.adjust = $1,4 \times 10^{-3}$), la “angiogénesis” (GO:0001525; p.adjust = $1,0 \times 10^{-2}$), la “contracción del músculo liso” (GO:0006939; p.adjust = $3,3 \times 10^{-3}$), la “regulación de la fagocitosis” (GO:0060099; p.adjust = $1,4 \times 10^{-2}$) y la “regulación negativa de la vía de señalización del receptor de andrógenos” (GO:0060766; p.adjust = $3,1 \times 10^{-2}$). Todas estas categorías se encontraron en el análisis GO de Inact-up-DEG pero no en el de Act-up-DEG (Figura 6.16; (Tablas Suplementarias *M. duodecimcostatus* S2-4)

Las células de Sertoli desempeñan un papel fundamental en el apoyo a la espermatogénesis, incluyendo el suministro de nutrientes, el mantenimiento de las uniones celulares y la regulación de la dinámica de la BTB. También regulan la entrada de las células germinales en mitosis y meiosis. Sabemos que la BTB no es funcional en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus* (Lao-Pérez *et al.*, 2021), y de acuerdo con esto, encontramos un término GO enriquecido en la “regulación negativa de la adhesión celular”. Durante nuestro análisis, también encontramos varios términos GO relacionados con rutas moleculares implicadas en la señalización de las células de Sertoli que participan en la regulación de la espermatogénesis y la dinámica de la BTB (Figura 6.18; (Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S2), incluyendo la “regulación positiva de las vías de señalización MAPK” (GO:0043410; p.adjust = $7,0 \times 10^{-3}$) (Ni *et al.*, 2019), “ERK1 y ERK2” (GO:0070371; p.adjust = $4,5 \times 10^{-5}$) (Zhang *et al.*, 2014), “fosfatidilinositol 3-cinasa” (GO:0014065; p.adjust = $2,8 \times 10^{-2}$) (Siu *et al.*, 2005) y la “regulación de la concentración de iones de calcio citosólico” (GO:0051480; p.adjust = $2,7 \times 10^{-4}$) (Gorzynska y Handelsman, 1995). Todos estos términos se encontraron también en el análisis GO de Inact-up-DEG (Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S4), entre los que también encontramos categorías implicadas en el control genético de la

6. RESULTADOS

integridad de la BTB y la espermatogénesis, como la “vía de señalización canónica WNT” (GO:0060070; $p.adjust = 1,8 \times 10^{-5}$) (López *et al.*, 2019) y la “respuesta ante el estímulo del factor de crecimiento transformante β ” (GO:0071560; $p.adjust = 1,3 \times 10^{-10}$) (Ni *et al.*, 2019).

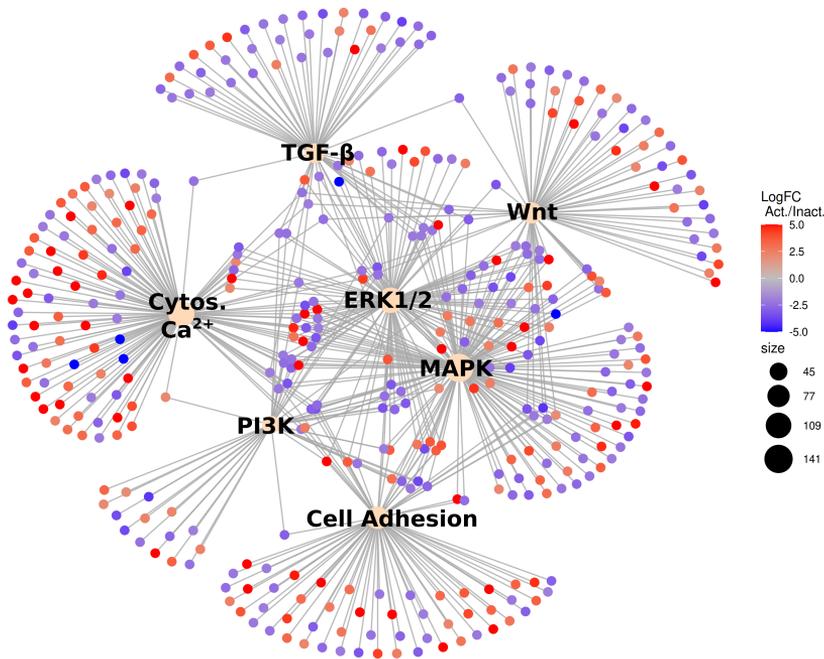


Figura 6.18: Análisis de asociación “genes-categorías” usando DEGs entre testículo activo e inactivo de *M. duodecimcostatus*, pertenecientes a categorías asociadas con rutas moleculares implicadas en el control de la espermatogénesis y la adhesión celular. El color rojo indica sobre-expresión en el testículo activo y el color azul sobre-expresión en el testículo inactivo. El tamaño de los círculos sepia es proporcional al número de genes desregulados que representan.

El análisis del tipo “genes-categorías” (“gene-concept”) usando categorías asociadas a rutas moleculares identificadas en nuestro análisis de términos GO mostró una red muy compleja en la que la vía de señalización MAPK/ERK ocupaba una posición central, compartiendo muchos genes con las otras categorías. En este análisis también incluimos el término GO

6.2. MICROTUS DUODECIMCOSTATUS

“regulación negativa de la adhesión celular” (GO:0022408; $p.adjust = 4,5 \times 10^{-2}$), el cual compartía muchos genes con otras vías de señalización (Figura 6.18).

La visualización de los DEGs pertenecientes a la ruta KEGG MAPK (mmu04010) confirmó que los Inact-up-DEGs estaban preferentemente sobre-expresados en el testículo inactivo en todos los pasos de esta vía de señalización (Figura 6.19).

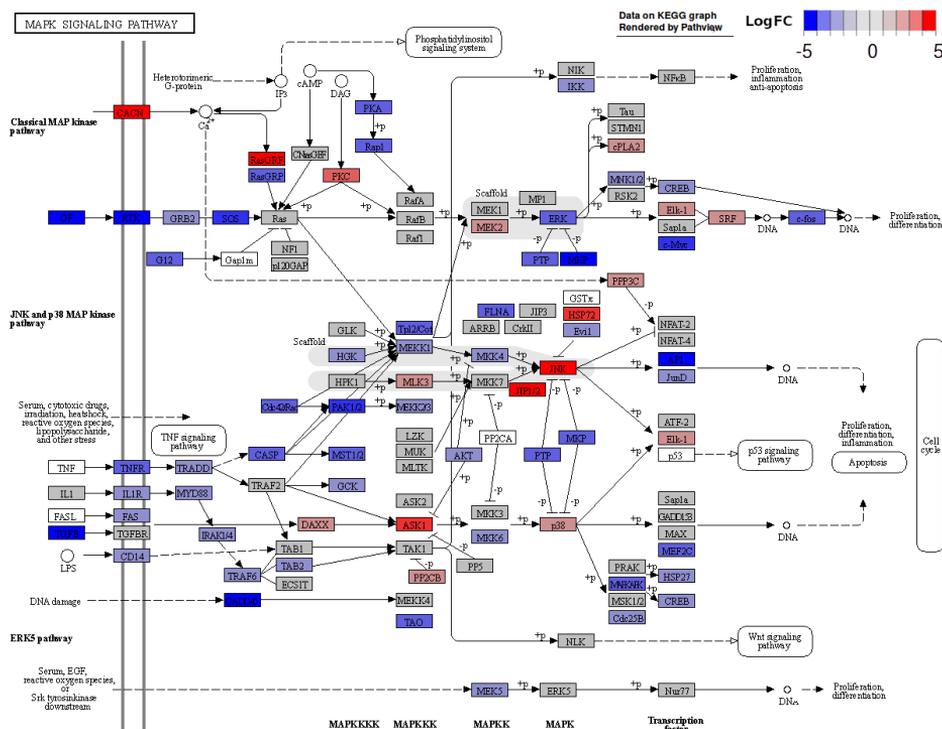


Figura 6.19: Visualización de los genes expresados diferencialmente en la vía de señalización MAPK Comparación entre los testículos activos e inactivos de *M. duodecimcostatus*. El color rojo indica activación en los testículos activos y el color azul en los testículos inactivos.

En conjunto, estos resultados indican que la activación de la vía de señalización MAPK/ERK, y su interacción con otras vías como WNT, TGF- β , regulación del Ca²⁺ citosólico y PI3K desempeña papeles

6. RESULTADOS

importantes en el control de las funciones testiculares durante el ciclo reproductivo de *M. duodecimcostatus*, incluyendo la regulación de las moléculas de adhesión celular.

6.2.3 El testículo inactivo de *M. duodecimcostatus* pierde el “inmunoprivilegio” que normalmente opera en un testículo funcional

En el análisis GO de los DEGs también identificamos varios términos GO enriquecidos relacionados con la respuesta inmune, (Figura 6.16), incluyendo “activación de macrófagos” (GO:0042116; p.adjust = $2,6 \times 10^{-3}$), “regulación positiva de la respuesta inflamatoria” (GO:0050729; p.adjust = $4,0 \times 10^{-3}$) y “regulación de la proliferación de linfocitos” (GO:0050670; p.adjust = $2,1 \times 10^{-2}$), entre otros. También encontramos términos GO asociados con las rutas genéticas implicadas en el control genético del sistema inmunitario, como “regulación de la producción del factor de necrosis tumoral” (GO:0032680; p.adjust = $1,5 \times 10^{-2}$) y “regulación de la secreción de citoquinas” (GO:0050707; p.adjust = $1,8 \times 10^{-2}$; Figura 6.20; (Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S2). Al igual que antes, todos estos términos se encontraron en el análisis GO de Inact-up-DEG (Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S4), pero no en el de Act-up-DEG (Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S3). Un análisis de asociación “genes-categorías” realizado utilizando estos datos mostró una red en la que tanto el factor TNF como la producción de citoquinas comparten muchos genes con otros términos GO. (Figura 6.20).

La visualización de los DEGs pertenecientes al término KEGG “TNF” (mmu04668) confirmó una mayor abundancia de Inact-up-DEG en todos los pasos de esta vía de señalización que conduce al reclutamiento y la activación de los leucocitos (Figura 6.21). El predominio del color azul en esta figura indica que gran parte de los componentes de esta vía de señalización se activan durante la regresión testicular, lo que sugiere que la modulación de la respuesta inmunitaria es un proceso importante durante la regresión testicular

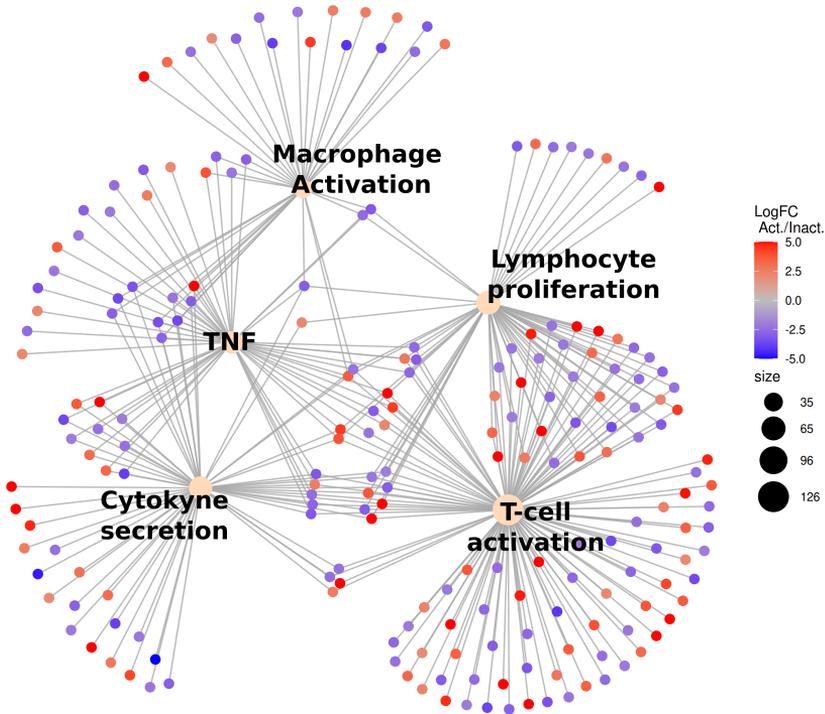


Figura 6.20: Análisis de asociación “genes-categorías” usando DEGs entre testículo activo e inactivo de *M. duodecimcostatus*, pertenecientes a categorías asociadas con la activación del sistema inmunitario. El color rojo indica sobre-expresión en el testículo activo y el color azul sobre-expresión en el testículo inactivo. El tamaño de los círculos sepa es proporcional al número de genes desregulados que representan.

6. RESULTADOS

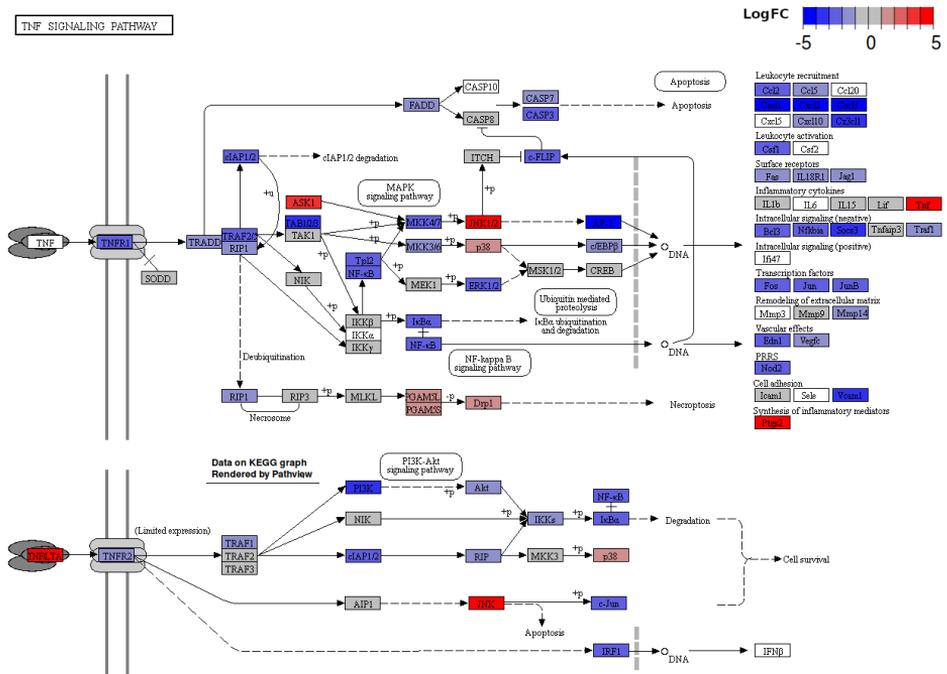


Figura 6.21: Visualización de los genes expresados diferencialmente de la vía de señalización del TNF. Comparación entre los testículos activos e inactivos de *M. duodecimcostatus*. El color rojo indica sobre-expresión en los testículos activos y el color azul en los testículos inactivos

6.3 *Talpa occidentalis*

6.3.1 Rutas moleculares que controlan la adhesión celular en el epitelio germinativo y la respuesta inmune están alteradas en los testículos inactivos de *T. occidentalis*

En el sur de la Península Ibérica, el topo ibérico, *Talpa occidentalis*, se reproduce en invierno (de noviembre a marzo) mientras que no lo hace en verano (julio-septiembre). Los túbulos testiculares en la época de reproducción presentan un epitelio seminífero bien estructurado con abundantes espermatozoides en el lumen. Por el contrario, en la época no reproductiva, los túbulos testiculares están muy reducidos, el epitelio seminífero casi ausente, la espermatogénesis está detenida y no se observan espermatozoides maduros en el lumen (Figura 6.22) (Dadhich *et al.*, 2010, 2013).

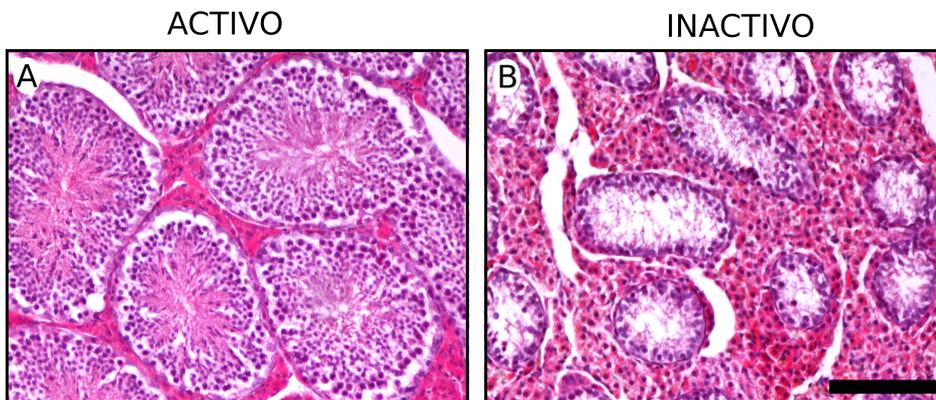


Figura 6.22: Regresión testicular en *T. occidentalis*. Corte histológico de un testículo activo (A) y otro inactivo (B) de *T. occidentalis* teñidos con hematoxilina y eosina. La barra de escala en B representa 100 μ en A y B.

Para encontrar diferencias de expresión génica, realizamos RNA-seq a partir de testículos activos e inactivos de *T. occidentalis*. El gráfico de escalamiento multidimensional (MDS plot) mostró que las muestras correspondiente a la misma época del ciclo estacional se agrupan juntas, lo

6. RESULTADOS

que indica una alteración consistente en el transcriptoma de los testículos entre las temporadas activas e inactivas (Figura 6.23 arriba)

El análisis de expresión diferencial reveló que 7049 genes estaban expresados diferencialmente (DEGs) entre ambas condiciones, de los cuales 3684 estaban sobre-expresados en testículos activos (Act-up-DEG) y 3365 infra-expresados en los testículos inactivos (Inact-up-DEG) ($FDR < 0,05$ y $|\log_2FC| > 1$; (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S1) (Figura 6.24).

El análisis de ontología génica (GO) de los DEGs mostró un enriquecimiento significativo ($P_{\text{adjust}} < 0,05$) en varias categorías, muchas de ellas asociadas a procesos biológicos que ocurren durante la espermatogénesis y espermiogénesis, incluyendo “organización de los cilios” (GO:0044782; $P_{\text{adjust}} = 8,04 \times 10^{-22}$), “movimiento basado en microtúbulos” (GO:0007018; $P_{\text{adjust}} = 1,44 \times 10^{-15}$), “ciclo celular meiótico” (GO:0051321; $P_{\text{adjust}} = 1,47 \times 10^{-8}$), “desarrollo de espermátidas” (GO:0007286; $P_{\text{adjust}} = 7,1 \times 10^{-5}$) y “motilidad de los espermatozoides” (GO:0097722; $P_{\text{adjust}} = 3,1 \times 10^{-4}$), entre otros (Figura 6.25; (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S2).

Como hemos mencionado, la espermatogénesis está interrumpida en los testículos de los topos inactivos, y por lo tanto, los altos niveles de expresión de genes meióticos y postmeióticos encontrados en los testículos activos en comparación con los inactivos no reflejarán cambios fisiológicos en la expresión génica, sino diferencias en el contenido de células germinales entre los testículos de ambas estaciones. Esta sobrerrepresentación de genes específicos de células germinales en los testículos activos va a enmascarar los cambios en la expresión génica de las células somáticas, que son las que tienen un papel primordial en el control del ciclo espermatogénico, en particular el de las células de Sertoli. Para corregir esto, decidimos omitir una serie de marcadores específicos de las células germinales en nuestro análisis transcriptómico, como se ha descrito en la sección de Material y Métodos. Al hacer esto, la distancia entre las muestras activas e inactivas se redujo en el gráfico de escalado multidimensional (Figura 6.23 abajo), lo que indica que nuestra aproximación elimina las diferencias derivadas del distinto contenido de células germinales presente en los testículos de las estaciones activas e inactivas.

Tras esta normalización, identificamos 4327 DEGs, 2272 Act-up-DEGs y 2055 Inact-up-DEGs (Figura 6.26; (Tabla suplementaria *T. occidentalis*

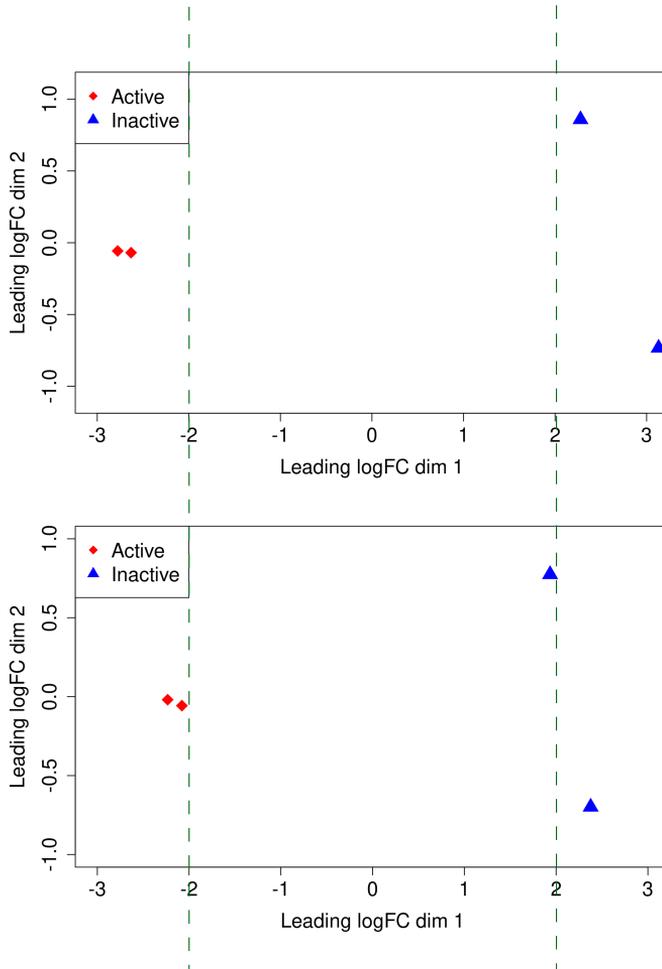


Figura 6.23: Análisis de clusterización de las muestras de testículo.

Gráfico de escala multidimensional de las muestras de testículos activos e inactivos utilizadas en este estudio antes (arriba) y después (abajo) de la normalización. Obsérvese que, tras la normalización, se reduce la distancia entre las muestras activas e inactivas.

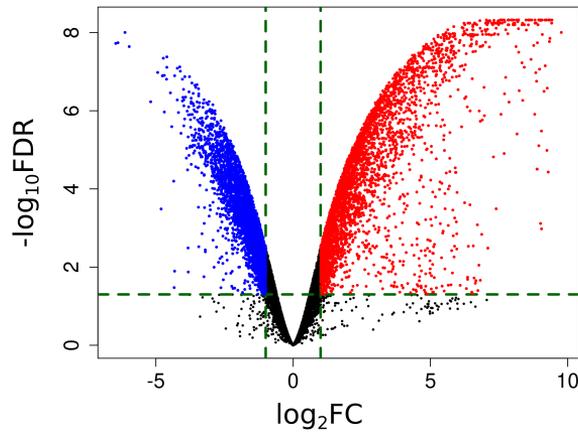


Figura 6.24: Diagrama de dispersión tipo “volcano plot” mostrando genes con expresión diferencial entre testículos activos e inactivos de *T. occidentalis* antes de la normalización. La magnitud del cambio viene indicada en el eje de abscisas mediante el log₂FC entre ambas condiciones. En el eje de ordenadas se representa el nivel de significación estadística mediante el -log₁₀(FDR). El color rojo indica sobreexpresión en los testículos activos y el color azul sobreexpresión en los testículos inactivos.

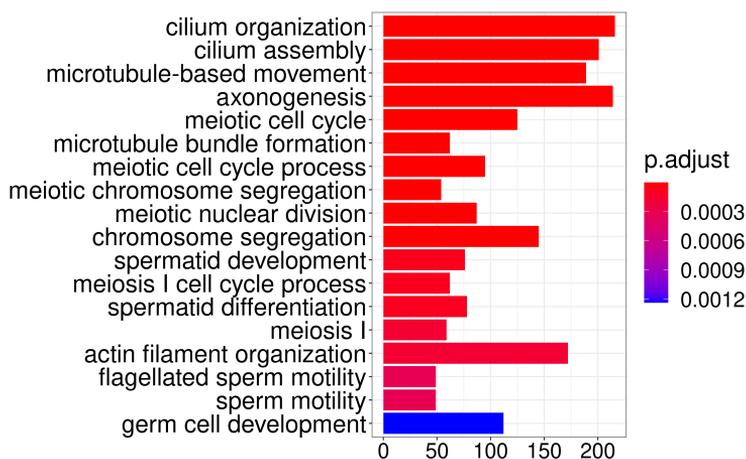


Figura 6.25: Análisis de términos GO usando genes diferencialmente expresados entre testículos activos e inactivos de *T. occidentalis* antes de la normalización

S3). El análisis GO de los DEGs, incluyendo tanto los Act-up-DEGs como los Inact-up-DEGs, mostró un enriquecimiento significativo ($P_{\text{adjust}} < 0,05$) en una serie de funciones biológicas, muchas de ellas estrechamente relacionadas (Figura 6.27; (Tablas suplementarias *T. occidentalis* S4-6). Entre los más significativos, encontramos términos relacionados con la adhesión celular del epitelio seminífero, incluyendo “organización de la matriz extracelular” (GO:0030198; $P_{\text{adjust}} = 7,13 \times 10^{-19}$), “ensamblaje de la unión celular” (GO:0034329; $P_{\text{adjust}} = 1,2 \times 10^{-8}$) “adhesión célula-matriz” (GO:0007160; $P_{\text{adjust}} = 1 \times 10^{-4}$) y “ensamblaje de la adhesión focal” (GO:0048041; $P_{\text{adjust}} = 1 \times 10^{-2}$) entre otros. A continuación, buscamos procesos biológicos relacionados con rutas moleculares que operan en células de Sertoli adultas y que participan en la regulación de la espermatogénesis y la dinámica de la BTB y encontramos términos GO como “regulación de la actividad de la MAP Kinase” (GO:0043405; $P_{\text{adjust}} = 1,25 \times 10^{-5}$) (Ni *et al.*, 2019), “señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa” (GO:0014065 $P_{\text{adjust}} = 1,5 \times 10^{-4}$) (Siu *et al.*, 2005), “regulación de la actividad GTPasa” (GO:0043087; $P_{\text{adjust}} = 2,6 \times 10^{-4}$) (Lui *et al.*, 2003), “cascada ERK1 y ERK2”(GO:0070371, P_{adjust}

6. RESULTADOS

= $1,4 \times 10^{-3}$) (Zhang *et al.*, 2014), “regulación de la concentración de iones calcio citosólicos” (GO:0051480; P_{adjust} = $1,8 \times 10^{-3}$; (Gorczyńska-Fjälling, 2004), “respuesta al factor de crecimiento transformante beta” (GO:0071559; P_{adjust} = $2,2 \times 10^{-3}$) (Ni *et al.*, 2019) y “señalización mediada por AMPc” (GO:0019933; P_{adjust} = 7×10^{-3}) (Fix *et al.*, 2004). El análisis de asociación “genes-categorías” (“gene-concept”) utilizando estos datos dio como resultado una gran red en la que la ruta de señalización MAPK/ERK1/2 ocupaba una posición central compartiendo muchos genes con las otras rutas moleculares y con el proceso biológico “ensamblaje de la unión celular” (Figura 6.28).

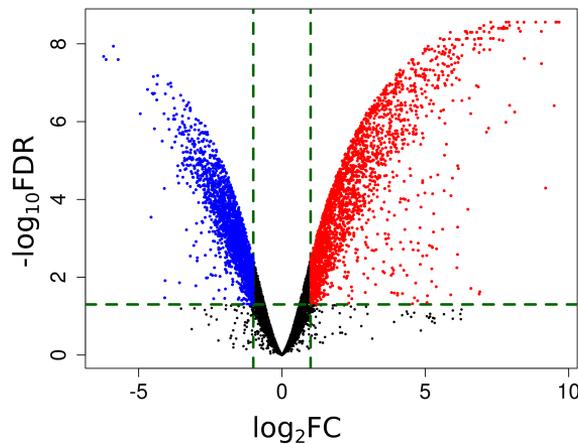


Figura 6.26: Diagrama de dispersión tipo “volcano plot” mostrando genes con expresión diferencial entre testículos activos e inactivos de *T. occidentalis* después de la normalización. La magnitud del cambio viene indicada en el eje de abscisas mediante el \log_2FC entre ambas condiciones. En el eje de ordenadas se representa el nivel de significación estadística mediante el $-\log_{10}(FDR)$. El color rojo indica sobreexpresión en los testículos activos y el color azul sobreexpresión en los testículos inactivos.

El análisis GO también reveló un enriquecimiento en genes que participan en la respuesta inmunitaria (Figura 6.27), entre los que se incluyen la “regulación positiva de la actividad del factor de transcripción NF-

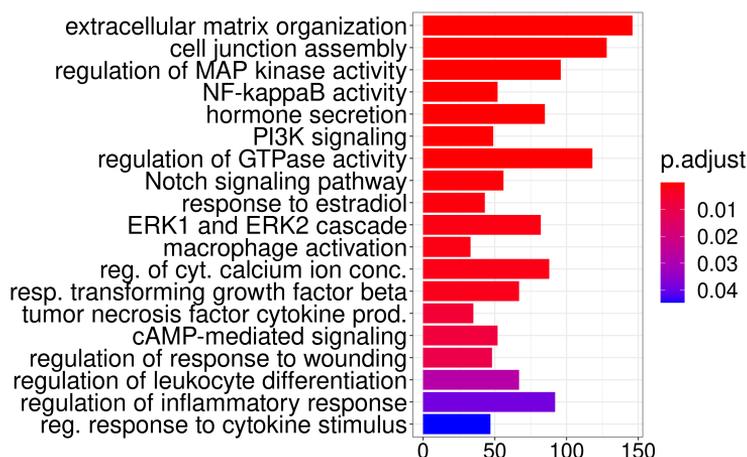


Figura 6.27: Análisis de términos GO usando genes diferencialmente expresados entre testículos activos e inactivos de *T. occidentalis* después de la normalización

kappaB” (GO:0051092; P_{adjust} = 7.7×10^{-5}), “activación de macrófagos” (GO:0042116; P_{adjust} = 1×10^{-3}), “producción de citoquinas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral” (GO:0071706; P_{adjust} = 6×10^{-3}), “regulación de la diferenciación de leucocitos” (GO:1902105; P_{adjust} = 2×10^{-2}), “regulación de la respuesta inflamatoria” (GO:0050727; 3.8×10^{-2}) y “regulación de la respuesta al estímulo de citoquinas” (GO:0060759; P_{adjust} = 4×10^{-2}). Todos estos términos se encontraron también en la lista Inact-up-DEG (Tabla Suplementaria *T. occidentalis* S6), pero no en la lista Act-up-DEG (Tabla Suplementaria *T. occidentalis* S5). El análisis de asociación “genes-categorías” con estos datos mostró una red en la que tanto el TNF como la señalización NF-KappaB comparten muchos genes con procesos biológicos implicados en la activación del sistema inmunitario (Figura 6.29). Los genes que forman esta red estaban preferentemente sobre-expresados en los testículos inactivos (puntos azules de la Figura 6.29), lo que indica que en los testículos inactivos el sistema inmunitario está activado.

6. RESULTADOS

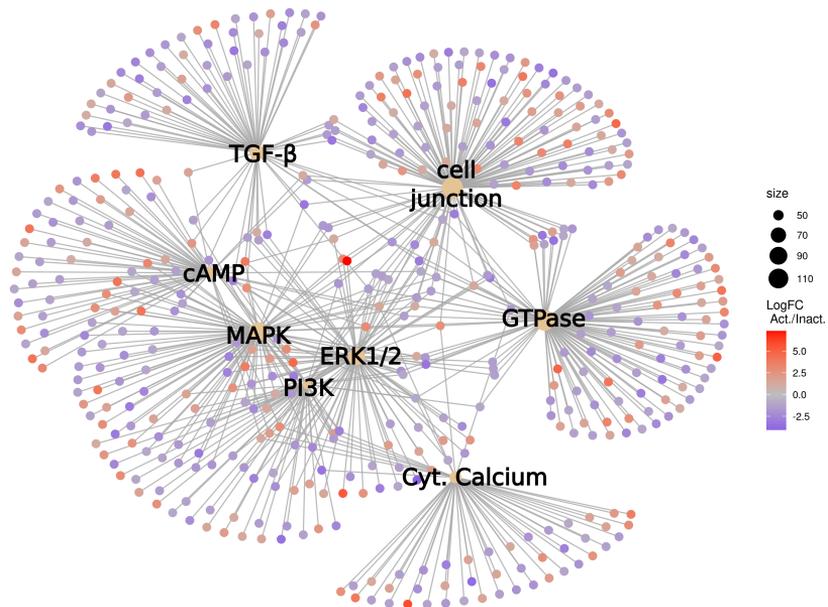


Figura 6.28: Cnetplot de varios términos GO significativamente enriquecidos asociados a varias rutas moleculares. El color rojo indica sobre-expresión en el testículo activo y el color azul sobre-expresión en el testículo inactivo. El tamaño de los círculos sepa es proporcional al número de genes desregulados que representan.

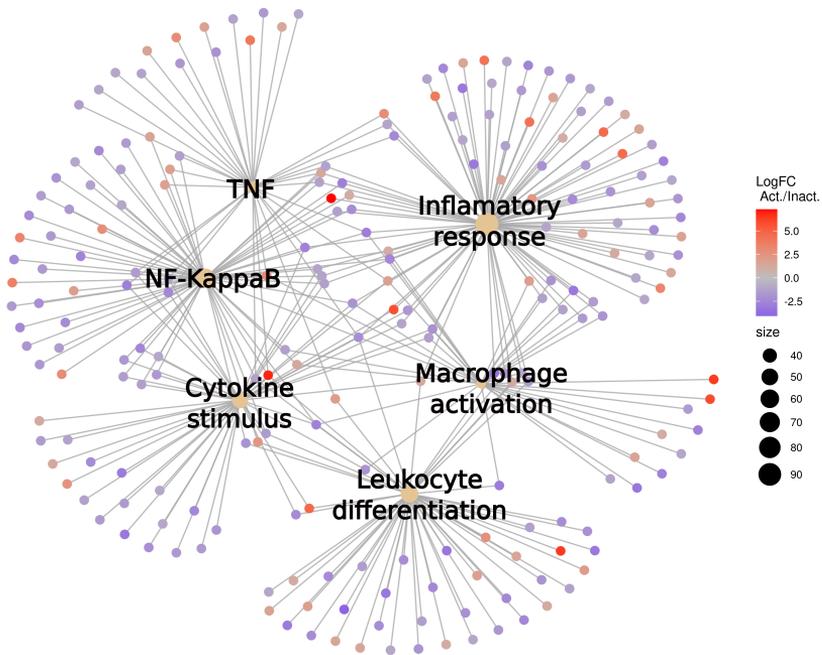


Figura 6.29: Cnetplot de varios términos GO significativamente enriquecidos asociados a la activación del sistema inmunitario. El color rojo indica sobre-expresión en el testículo activo y el color azul sobre-expresión en el testículo inactivo. El tamaño de los círculos sepa es proporcional al número de genes desregulados que representan.

6. RESULTADOS

6.3.2 Cambios transcriptómicos al inicio de la regresión testicular en *Talpa occidentalis*

Nuestro análisis anterior reveló que varias rutas moleculares están alteradas en los testículos inactivos cuando se comparan con los activos, sin embargo, estos resultados pueden no ser indicativos de los procesos biológicos que son inicialmente responsables de la regresión de los testículos activos. En el topo, la regresión testicular se produce durante los meses de primavera (abril-mayo), cuando los túbulos testiculares comienzan a regresionar, el epitelio germinativo se desorganiza, y tiene lugar una descamación masiva de las células germinales meióticas y postmeióticas del compartimento adluminal (Figura 6.30) (Dadhich *et al.*, 2010, 2013).

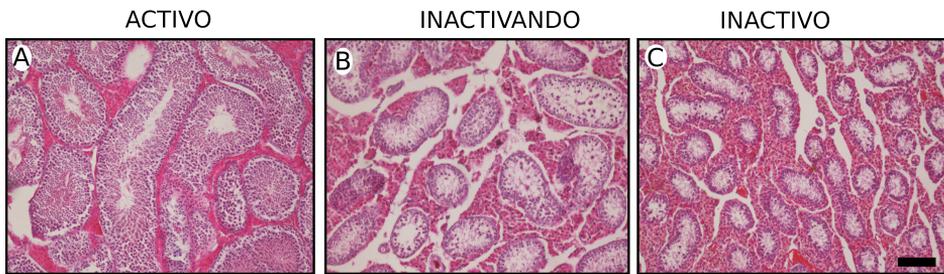


Figura 6.30: Inicio de la regresión testicular en *T. occidentalis*. Corte histológico de un testículo activo (A), otro en proceso de regresión (inactivando) y otro inactivo (C) de *T. occidentalis* teñidos con hematoxilina y eosina. Fíjese en el tamaño intermedio de los túbulos seminíferos del testículo en regresión. La barra de escala en C representa 100μ en A, B y C.

Debido a esto, capturamos topos en abril y generamos transcriptomas de testículos que estaban llevando a cabo el proceso de regresión (inactivando). El gráfico de escalamiento multidimensional mostró que las muestras correspondientes a la misma estación reproductiva se agrupan juntas, y que las muestras inactivando se sitúan entre las activas y las inactivas. En este gráfico, la separación de las muestras inactivando de los activos es menor que con la de los inactivos, confirmando que obtuvimos transcriptomas correspondientes a testículos que se encontraban en el inicio del proceso de regresión (Figura 6.31). El análisis de expresión diferencial entre testículos activos e inactivos identificó 452 DEGs, de los cuales 245 eran

Act-up-DEGs y 207 Inact-up-DEGs ($FDR < 0,05$ y $|\log_2FC| > 1$; (Figura 6.32; (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S7), un número mucho menor que el número de DEGs entre testículos activos e inactivos (ver arriba). De estos 452 DEGs, 446 también tenían expresión diferencial entre los testículos activos e inactivos. Todos los genes que estaban sobre-regulados en los testículos activos en una comparación (activo/inactivo) también lo estaban en la otra (activo/inactivando). Lo mismo ocurrió con los genes sobre-regulados en los testículos inactivos e inactivando (Figura 6.33; ver \log_2FCs en la (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S8). En general, la amplitud de los cambios en la expresión génica entre la comparación activo/inactivo fue mayor que en la comparación activo/inactivando (Figura 6.33, nótese que los \log_2FCs varían entre -5 y 9 en el primer caso (eje x), y entre -3 y 3 en el segundo (eje y); (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S8). Esto también se pudo comprobar por el hecho de que para la mayoría de los genes la magnitud del cambio en la expresión génica ($|\log_2FC|$) es mayor en la comparación activo/inactivo que en la comparación activo/inactivando (puntos rojos en la Figura 6.33; (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S8).

El análisis de GO de los DEGs entre los testículos activos y los inactivos reveló un enriquecimiento significativo ($P_{adjust} < 0,05$) en una serie de procesos biológicos (Figura 6.34; (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S9), entre ellos “organización de la matriz extracelular” (GO:0030198; $P_{adjust} = 1 \times 10^{-2}$), “regulación del ensamblaje de la unión celular” (GO:1901888; $P_{adjust} = 4 \times 10^{-2}$), “regulación de la cicatrización de heridas” (GO:0061041; $4,3 \times 10^{-2}$) y “diferenciación de leucocitos mieloides” (GO:0002573; $P_{adjust} = 4,5 \times 10^{-2}$). Estas categorías también se identificaron en el análisis de GO de los testículos activos e inactivos, aunque en este caso el enriquecimiento era más significativo (menor P_{adjust}) y el número de DEGs era mucho mayor (Figura 6.27; (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S4). No encontramos ningún término GO significativamente enriquecido asociado a ninguna ruta de señalización. Por ello, decidimos buscar DEGs entre los testículos activos e inactivos en los términos GO correspondiente a rutas moleculares identificadas en el análisis anterior (Figura 6.27; (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S4). De esta manera encontramos 15 genes pertenecientes a la “regulación de la actividad MAP quinasa” (GO:0043405), 14 genes a la “cascada

6. RESULTADOS

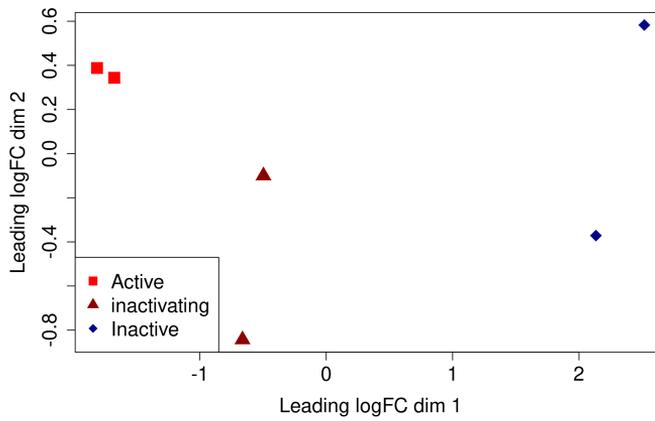


Figura 6.31: Análisis de clusterización de las muestras de testículo.

Gráfico de escala multidimensional de las muestras de testículos activos, inactivando e inactivos utilizadas en este estudio. Obsérvese que las muestras correspondientes a la misma estación reproductiva se agrupan juntas, y que las muestras inactivando se sitúan entre las activas y las inactivas.

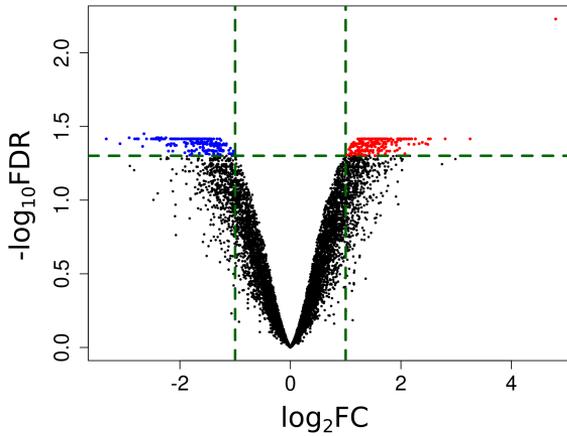


Figura 6.32: Diagrama de dispersión tipo “volcano plot” mostrando genes con expresión diferencial entre testículos activos y en activación de *T. occidentalis*. La magnitud del cambio viene indicada en el eje de abscisas mediante el \log_2FC entre ambas condiciones. En el eje de ordenadas se representa el nivel de significación estadística mediante el $-\log_{10}(FDR)$. El color rojo indica sobreexpresión en los testículos activos y el color azul sobreexpresión en los testículos inactivos.

6. RESULTADOS

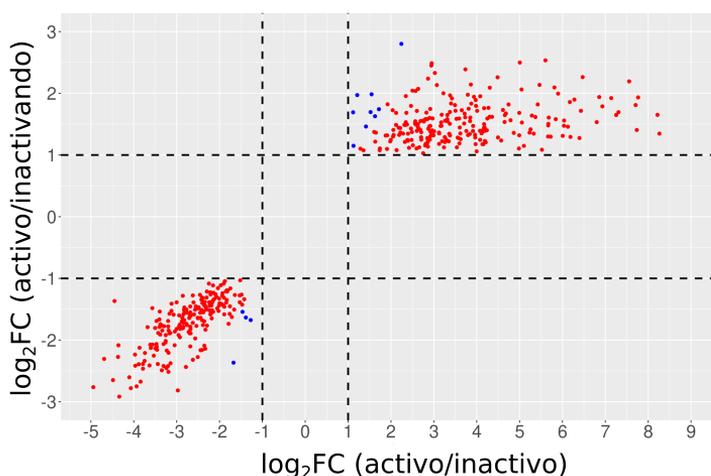


Figura 6.33: Diagrama de dispersión comparando los \log_2FC obtenidos tras la expresión génica diferencial entre los testículos activos/inactivos frente a la de los testículos activos/inactivando.

ERK1 y ERK2” (GO:0070371), 11 a la “respuesta al factor de crecimiento transformante beta” (GO:0071559) y 10 a la “regulación de la actividad GTPasa” (GO:0043087; Tabla suplementaria *T. occidentalis* S10). El análisis de asociación “genes-categorías” con estos DEGs reveló una red de interacción en la que se podían encontrar genes compartidos por varias categorías (Figura 6.35). En conjunto, estos resultados indican que durante la regresión de los testículos los genes pertenecientes a varias rutas moleculares empiezan a estar desregulados, y cuando el proceso de regresión avanza, estas rutas genéticas sufren una desregulación mucho más severa que es responsable del mantenimiento del estado de regresión de los testículos inactivos de *T. occidentalis*. En este proceso la ruta de señalización molecular MAPK/ERK1/2 parece desempeñar un papel esencial.

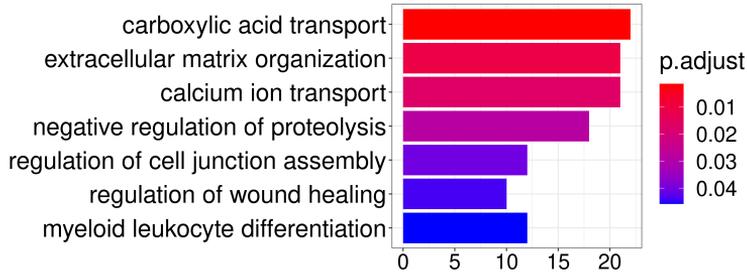


Figura 6.34: Análisis de términos GO usando genes diferencialmente expresados entre testículos activos e inactivando de *T. occidentalis* después de la normalización

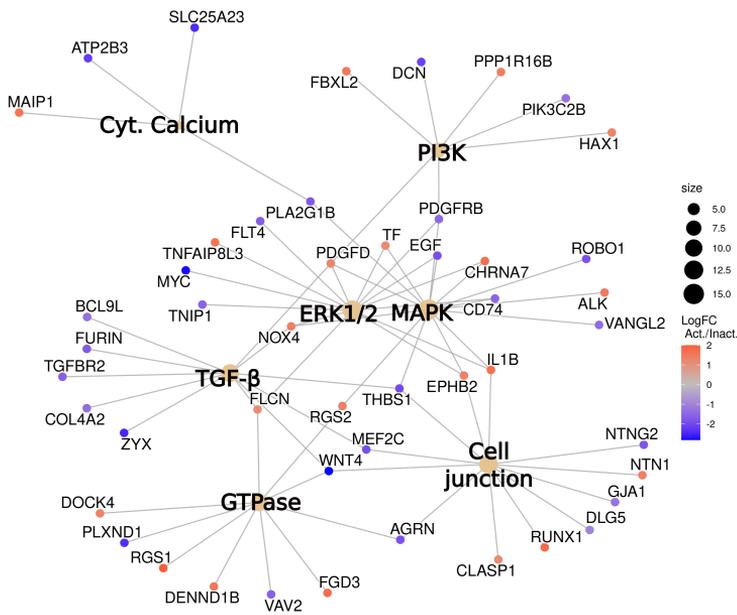


Figura 6.35: Cnetplot de varios DEGs pertenecientes a varias rutas moleculares. El color rojo indica sobre-expresión en el testículo activo y el color azul sobre-expresión en el testículo inactivo. El tamaño de los círculos sepa es proporcional al número de genes desregulados que representan.

6.3.3 Análisis transcriptómico de la espermatogénesis temprana en el testículo inactivo de *Talpa occidentalis*

A continuación investigamos la expresión génica en las células germinales existentes en el testículo regresionado. En consonancia con nuestras observaciones anteriores, la doble inmunofluorescencia para DMRT1, un marcador de células de Sertoli y espermatogonias, y para DMC1, un marcador de espermatoцитos en cigoténe y paquitene temprana, reveló que en los testículos inactivos las espermatogonias están activamente proliferando y que un número reducido de espermatoцитos alcanza el estadio de paquitene temprana (Figura 6.36) (Dadhich *et al.*, 2011). Debido a esto, decidimos estudiar el perfil de expresión de células que se encontraban en los primeros estadios de la espermatogénesis en los testículos activos e inactivos del topo ibérico. Para ello utilizamos la firma de expresión génica de clústeres espermatogénicos identificada por Hermann *et al.* (Hermann *et al.*, 2018), asignando genes expresados diferencialmente entre los testículos activos e inactivos (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S1) a cada uno de los clústeres espermatogénicos tempranos, desde espermatogonia indiferenciada hasta paquitene (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S11). Dentro de estos grupos, el número de genes sobre-expresados en el testículo activo aumentaba a medida que la espermatogénesis progresaba, y en paquitene la mayoría de los DEGs estaban sobre-expresados en los testículos activos (Figura 6.37), lo que es probablemente es una consecuencia del mayor número de espermatoцитos en paquitene en los testículos activos, y por lo tanto, no refleja cambios en la expresión génica.

La comparación de temas biológicos obtenidos al analizar los Act-up-DEGs entre los diferentes clústeres (excluyendo el clúster de paquitene) reveló la existencia de un enriquecimiento de términos asociados a “poliubiquitinación de proteínas” (GO:0000209), “modificación covalente de la cromatina” (GO:0016569), “regulación de la organización cromosómica” (GO:0033044) y “metilación del ADN” (GO:0006306) en espermatogonias. A partir del estadio de espermatogonia diferenciada se identificaron categorías GO asociadas a la meiosis, incluyendo “segregación de cromosomas nucleares” (GO:0098813) y “división nuclear meiótica” (GO:0140013) entre otras (Figura 6.38; (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S12). Dado que estos últimos procesos biológicos no ocurren en las gónadas inactivas,

6.4. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE *T.OCCIDENTALIS* Y *M.DUODECIMCOSTATUS*

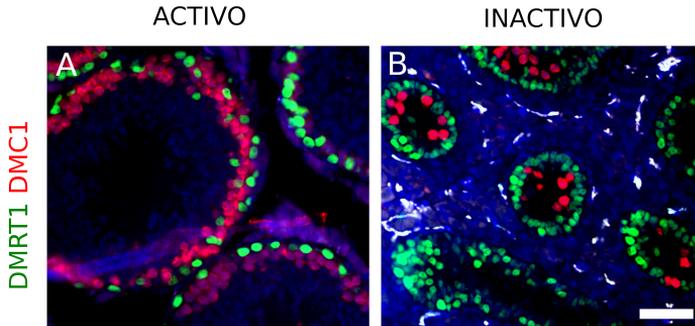


Figura 6.36: Análisis de las células germinales en el testículo inactivo de *T. occidentalis*. Doble inmunofluorescencia para DMRT1 (verde), marcador de las células de Sertoli y de la espermatogonias, y para DMC1 (rojo), marcador de espermatocitos en cigotene y paquitene temprana. En los testículos inactivos (A) las espermatogonias están activamente proliferando mientras que en los inactivos (B) sólo un número reducido de espermatocitos alcanza el estadio de paquitene temprana. Los núcleos se han teñido con DAPI. La barra de escala en B representa 50 μ en A y B.

la expresión diferencial encontrada para estos genes es de nuevo probablemente una consecuencia del diferente contenido de células germinales de los testículos activos e inactivos. La comparación de temas biológicos de los Inact-up-DEGs mostró un enriquecimiento en procesos biológicos generales como la “orientación cotranslacional de proteínas a la membrana” (GO:0006613), la “localización de proteínas al retículo endoplásmico” (GO:0070972) y la “respiración celular” (GO:0045333) entre otros (Figura 6.39; Tabla suplementaria *T. occidentalis* S13).

6.4 Análisis comparativo de rutas moleculares desreguladas en testículos inactivos de *Talpa occidentalis* y de *Microtus duodecimcostatus*.

Una vez finalizado el análisis transcriptómico de gónadas activas e inactivas tanto de *Talpa occidentalis* como de *Microtus duodecimcostatus*

6. RESULTADOS

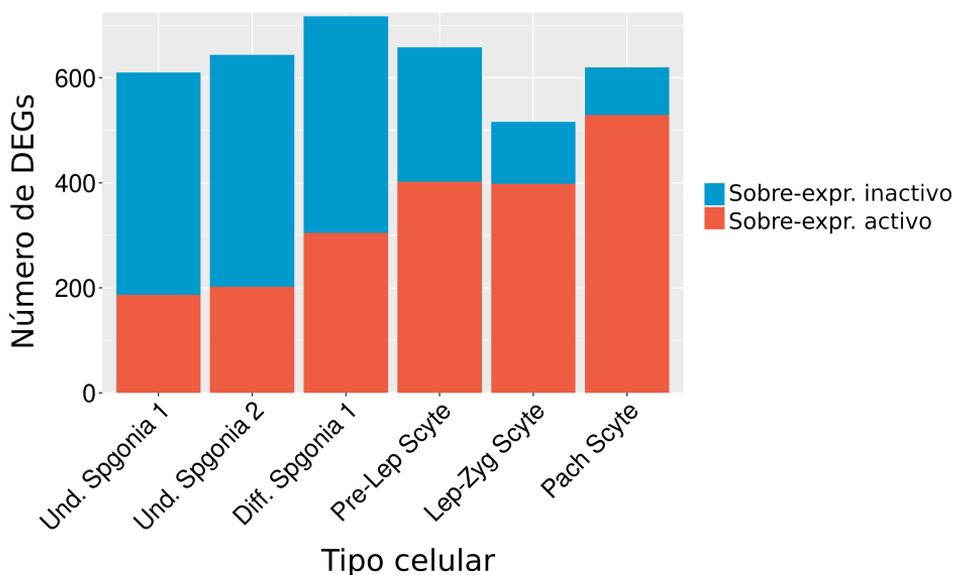


Figura 6.37: Análisis de las células germinales en el testículo inactivo de *T. occidentalis* Donde se representa el número de genes que están desregulados entre testículo activo e inactivo asignados a cada uno de los tipos celulares de las primeras etapas del ciclo espermatogénico. El color rojo indica sobre-expresión en el testículo activo y el color azul sobre-expresión en el testículo inactivo. Und. Spongia1: espermatogonia indiferenciada 1; Und. Spongia2: espermatogonia indiferenciada 2; Diff. Spongia: espermatogonia diferenciada; Pre-Lep Scyte: espermatocito en pre leptotene; Lep-Zyg Scyte: espermatocito entre los estadios leptotene y cigotene; Pach Scyte: espermatocito en paquitene

6.4. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE *T.OCCIDENTALIS* Y
M.DUODECIMCOSTATUS

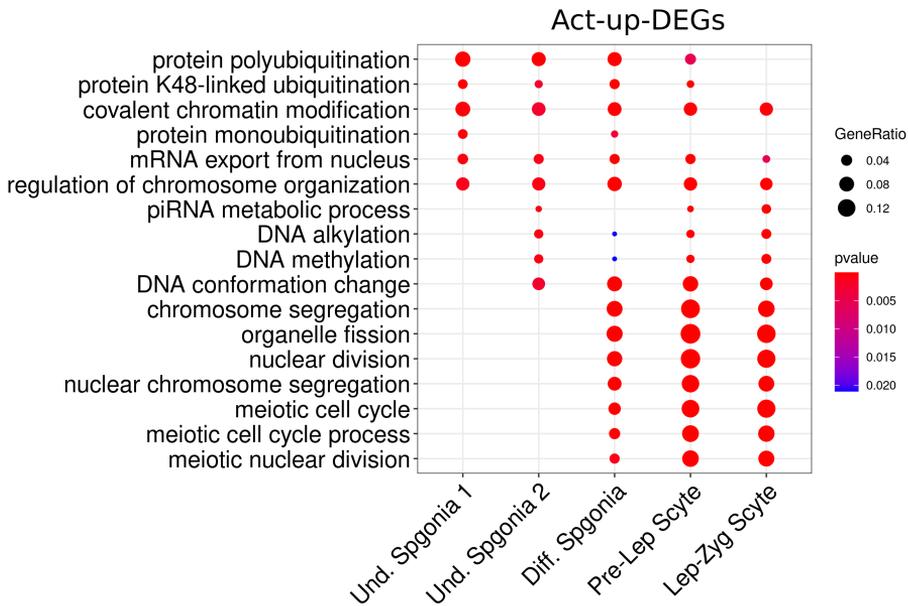


Figura 6.38: Comparación de temas biológicos obtenidos al analizar los Act-up-DEGs entre diferentes clústeres de células germinales. Und. Spgonia1: espermatogonia indiferenciada 1; Und. Spgonia2: espermatogonia indiferenciada 2; Diff. Spgonia: espermatogonia diferenciada; Pre-Lep Scyte: espermatocono en pre leptotene; Lep-Zyg Scyte: espermatocono entre los estadios leptotene y cigotene.

6. RESULTADOS

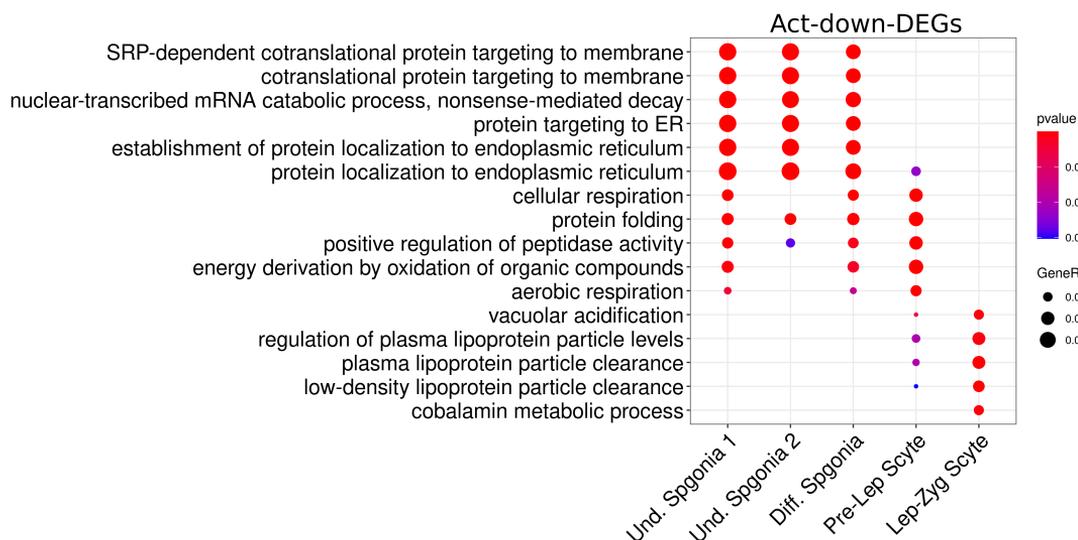


Figura 6.39: Comparación de temas biológicos obtenidos al analizar los Inact-up-DEGs entre diferentes clústeres de células germinales. Und. Spgonia1: espermatogonia indiferenciada 1; Und. Spgonia2: espermatogonia indiferenciada 2; Diff. Spgonia: espermatogonia diferenciada; Pre-Lep Scyte: espermatocono en pre leptotene; Lep-Zyg Scyte: espermatocono entre los estadios leptotene y cigotene.

6.4. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE *T.OCCIDENTALIS* Y *M.DUODECIMCOSTATUS*

comparamos ambos resultados para ver si existían rutas moleculares que estuviesen afectadas los testículos inactivos de ambas especies. Para ello, inicialmente buscamos genes que estuvieran sobre-regulados bien en los testículos activos o bien en los inactivos de ambas especies al mismo tiempo ($FDR < 0,05$ y $|\log_2FC| > 1$), e identificamos 1529 genes, 629 Act-up-DEG y 900 Inact-up-DEG (Tabla suplementaria *T. occidentalis* S14). Para estos genes generamos una gráfica en la que representamos el \log_2FC de una especie frente a la otra y encontramos que existía una correlación lineal entre ambos conjuntos de datos (Figura 6.40; test de correlación de Pearson, $cor.coeff = 0,85$; $p\text{-valor} < 2,2 \times 10^{-16}$) indicando que existían alteraciones comunes en la expresión génica en los testículos regresionados de ambas especies. El análisis GO de los DEGs reveló un enriquecimiento significativo ($P_{adj} < 0,05$) en una serie de procesos biológicos, la mayoría de ellos también identificados en nuestros análisis anteriores (Figura 6.41; Tabla suplementaria *T. occidentalis* S15), incluyendo “organización de la matriz extracelular” (GO:0030198; $P_{adj} = 1,27 \times 10^{-12}$) y “ensamblaje de la unión celular” (GO:0034329; $P_{adj} = 1,1 \times 10^{-3}$). También encontramos términos GO asociados a rutas moleculares que también se han identificado en análisis anteriores, como “regulación de la actividad de la MAP quinasa” (GO:0043405; $P_{adj} = 2,56 \times 10^{-6}$), “respuesta al factor de crecimiento transformante beta” (GO:0071559; $P_{adj} = 2,6 \times 10^{-4}$), “regulación de la actividad GTPasa” (GO:0043087; $P_{adj} = 2,4 \times 10^{-3}$), “cascada ERK1 y ERK2” (GO:0070371; $P_{adj} = 1,86 \times 10^{-3}$), “señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa” (GO:0014065; $P_{adj} = 4,6 \times 10^{-4}$) y “regulación de la concentración de iones de calcio citosólico” (GO:0051480; $P_{adj} = 5,3 \times 10^{-3}$). El análisis de asociación “genes-categorías” reveló una compleja red de interacción con genes compartidos por varias categorías (Figura 6.42).

Además, también identificamos varias categorías GO enriquecidas relacionadas con la activación del sistema inmunitario (Figura 6.43; Tabla suplementaria *T. occidentalis* S15), incluyendo “regulación positiva de la actividad del factor de transcripción NF-kappaB” (GO:0051092; $P_{adj} = 1,5 \times 10^{-5}$), “regulación positiva de la producción de citoquinas” (GO:0001819; $P_{adj} = 1,3 \times 10^{-3}$), “activación de macrófagos” (GO:0042116; $P_{adj} = 7,9 \times 10^{-3}$), “regulación de la producción de citoquinas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral” (GO:1903555;

6. RESULTADOS

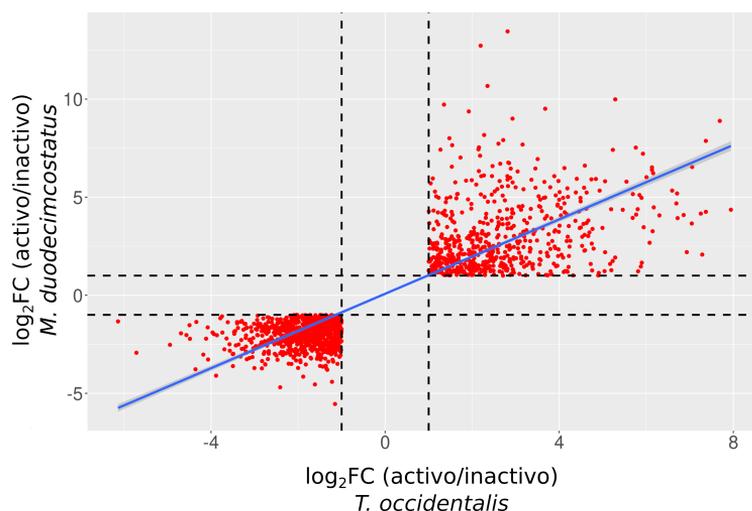


Figura 6.40: Diagrama de dispersión comparando los log₂FC de los DEGs entre testículos activos e inactivos de *T. occidentalis* frente a los de *M. duodecimcostatus*

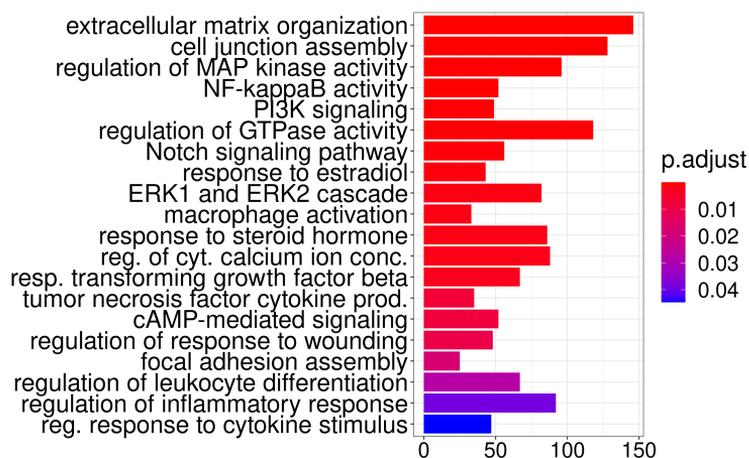


Figura 6.41: Análisis de términos GO de genes que se encuentran diferencialmente expresados en ambos, *T. occidentalis* y *M. duodecimcostatus*

6.4. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE *T.OCCIDENTALIS* Y *M.DUODECIMCOSTATUS*

Padjust = $5,4 \times 10^{-3}$) y “regulación de la diferenciación de leucocitos” (GO:1902105; $1,5 \times 10^{-2}$). El análisis de asociación “genes-categorías” de estos términos reveló de nuevo una red cooperativa en la que la mayoría de los genes estaban sobre-expresados en los testículos inactivos (puntos azules en la Figura 6.43), lo que indica que la activación del sistema inmunitario es una característica común en los testículos involucionados de ambas especies.

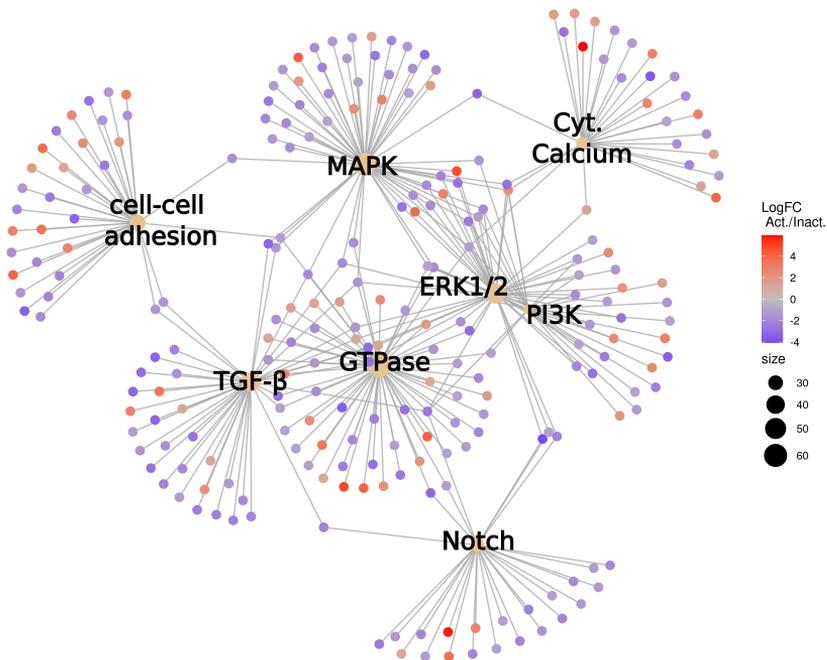


Figura 6.42: Análisis de asociación “genes-categorías” usando DEGs de ambos, *T. occidentalis* y *M.duodecimcostatus*, pertenecientes a varias rutas moleculares. El color rojo indica sobre-expresión en el testículo activo y el color azul sobre-expresión en el testículo inactivo. El tamaño de los círculos sepa es proporcional al número de genes desregulados que representan.

6. RESULTADOS

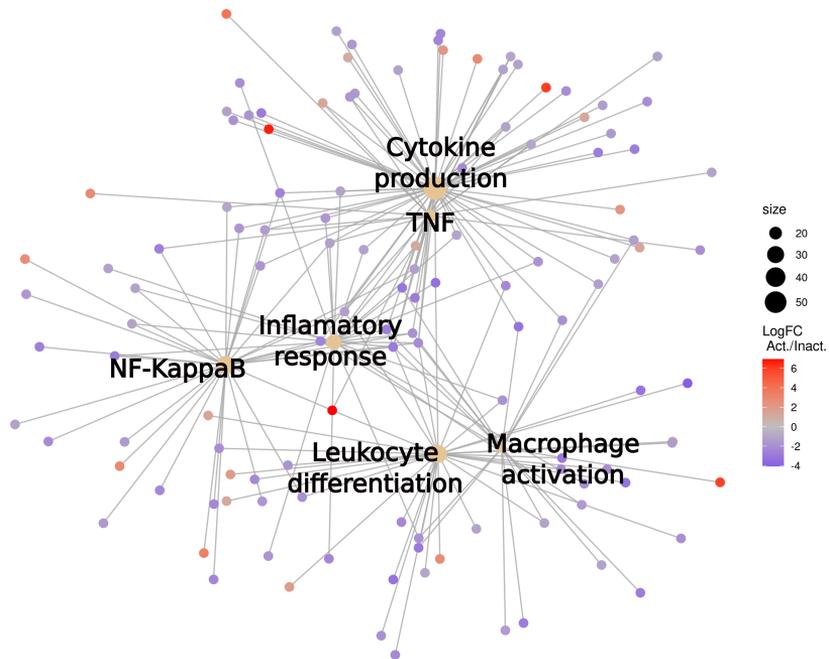


Figura 6.43: Análisis de asociación “genes-categorías” usando DEGs de ambos, *T. occidentalis* y *M. duodecimcostatus*, pertenecientes a categorías asociadas con el sistema inmunitario. El color rojo indica sobre-expresión en el testículo activo y el color azul sobre-expresión en el testículo inactivo. El tamaño de los círculos sepia es proporcional al número de genes desregulados que representan.

7. Discusión

7.1 Regresión testicular en *Hemiechinus auritus*

La regresión testicular es el proceso por el que los machos de las especies con reproducción estacional inactivan sus gónadas antes de entrar en el periodo de quiescencia del ciclo reproductivo anual. Esto suele producirse cuando el periodo no reproductivo es lo suficientemente largo, ya que en este caso la interrupción la espermatogénesis compensa el coste energético que supone llevar a cabo los procesos de regresión y activación testicular (Jiménez *et al.*, 2015). Actualmente se han estudiado varios mamíferos con reproducción estacional y una de las primeras conclusiones que se obtiene es que es evidente que no existe un mecanismo único de regresión testicular. Los estudios realizados hasta el momento han identificado dos procesos celulares principales por los que se eliminan masivamente las células germinales: la apoptosis y la descamación de células germinales (Jiménez *et al.*, 2015). Sin embargo, deben estudiarse más especies para determinar la prevalencia relativa de cada uno de estos procesos celulares, y, tal vez, descubrir nuevos mecanismos de regresión testicular. En la presente tesis doctoral hemos realizado el primer estudio exhaustivo de los cambios circanales que afectan a los testículos del erizo orejudo *H. auritus*. Nuestros resultados muestran que en esta especie el principal efector de regresión testicular es la descamación de las células germinales, como se ha descrito previamente tanto en el topo ibérico *T. occidentalis* (Dadhich *et al.*, 2013) como en el gran armadillo peludo *C. villosus* (Luaces *et al.*, 2014; González *et al.*, 2018). La presencia de abundantes espermatoцитos primarios (principalmente en cigotene y paquitene) en el lumen, tanto de los túbulos seminíferos como de los epidídimos, indica que las células meióticas inmaduras se desprenden precozmente del epitelio seminífero. Posteriormente, estas células germinales que se han

7. DISCUSIÓN

desprendido son eliminadas a través de la sección distal del tracto genito-urinario. Esto es coherente con la desorganización de la distribución de moléculas de adhesión celular que se observa en los túbulos seminíferos de los testículos que se están inactivando y de los inactivos.

La apoptosis es un proceso esencial que ocurre normalmente en los testículos fértiles funcionales. Facilita la regulación de la densidad de la población de espermatogonias y salvaguarda la integridad genética del gameto masculino, eliminando las células incapaces de superar los controles de calidad meiótica derivadas de una inadecuada sinapsis cromosómica (Pastor *et al.*, 2011; McClusky, 2012; Shukla *et al.*, 2012; Tripathi *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que la apoptosis es el proceso celular responsable de la regresión testicular estacional en muchas especies de tetrápodos, incluidos algunos mamíferos (Morales *et al.*, 2007; Pastor *et al.*, 2011; Young y Nelson, 2001; Strbenc *et al.*, 2003; Blottner *et al.*, 1995; Furuta *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 2002; Seco-Rovira *et al.*, 2014). Sin embargo, al igual que en el corzo, *Capreolus capreolus* (Blottner *et al.*, 2007), el topo ibérico *T. occidentalis* (Dadhich *et al.*, 2010), y el gran armadillo peludo, *C. villosus* (Luaces *et al.*, 2014), encontramos que la apoptosis no es la causa principal de la pérdida de células germinales en el testículo en regresión de *H. auritus*. La baja abundancia de células apoptóticas en los testículos en regresión apoya este hallazgo. Sin embargo, al igual que en el topo, la apoptosis juega un papel importante en los testículos inactivos de *H. auritus*, al eliminar todos los espermatoцитos primarios que alcanzan el estadio de paquitene.

Este proceso de eliminación de espermatoцитos mediado por la apoptosis es necesario porque el inicio de la meiosis no se interrumpe en los testículos inactivos de esta especie de erizo. La presencia tanto de túbulos seminíferos que contienen células positivas para DMC1, como de otros que carecen de ellas, en los testículos inactivos (al igual que en los activos), un hallazgo también descrito en el topo ibérico (Dadhich *et al.*, 2011), sugiere que el ritmo de entrada de la meiosis, que determina a su vez el ritmo del ciclo espermatogénico, se mantiene en los testículos de los machos inactivos de estas especies. Esto, a su vez, implica que los mecanismos que controlan el inicio de la meiosis siguen siendo funcionales en los testículos inactivos.

Alternativamente, los machos de otras especies que detienen comple-

7.1. REGRESIÓN TESTICULAR EN *HEMIECHINUS AURITUS*

tamente el inicio de la meiosis, muestran testículos que contienen sólo células de Sertoli y espermatogonias durante la época no reproductiva. Esta última estrategia es mucho más eficiente y menos costosa en términos energéticos para mantener los testículos estériles durante el periodo de descanso, y se esperaría que existieran más especies en las que los machos no reproductores detuvieran completamente la entrada de la meiosis. Paradójicamente, la primera estrategia es más frecuente en los tetrápodos. Por ejemplo, el inicio de la meiosis se mantiene en los testículos inactivos del tritón de vientre rojo japonés *Cynops pyrrhogaster* (Yazawa *et al.*, 2000), el zorro plateado *Vulpes vulpes* (Andersen Berg *et al.*, 2001), el hámster sirio *Mesocricetus auratus* (Morales *et al.*, 2007, 2002), la tortuga china de caparazón blando *Pelodiscus sinensis* (Zhang *et al.*, 2008), y el cuervo silvestre japonés *Corvus macrorhynchos* (Islam *et al.*, 2012) así como en el erizo de orejas largas *H. auritus* (presente trabajo), entre otros. Por otro lado, la inhibición completa de la entrada en la meiosis ocurre en los machos inactivos del ratón de patas blancas *Peromyscus leucopus* (Young *et al.*, 1999), el estornino europeo *Sturnus vulgaris* (Young y Nelson, 2001), el gran armadillo peludo *Chaetophractus villosus* (Luaces *et al.*, 2014, 2013) y el topillo mediterráneo, *Microtus duodecimcostatus* (Lao-Pérez *et al.*, 2021). La presencia de ambas estrategias en al menos dos clases (mamíferos y aves) de la superclase Tetrapoda, así como en diferentes clados dentro de estas clases, sugiere que ambos procesos pueden haber aparecido repetidamente durante la evolución de estos taxones. Según la teoría de Wright sobre cimas adaptativas (Wright, 1932), las especies que adoptan la estrategia de inhibición meiótica completa estarían ocupando un pico adaptativo más alto que el de las especies que conservan cierta actividad meiótica, pero estas especies no podrían beneficiarse de la otra estrategia, pasando de un pico al otro, porque esto requeriría una pérdida transitoria de eficacia biológica. Esto explicaría la persistencia de tantas especies que conservan cierta actividad meiótica durante la época no reproductiva.

Una característica común de la regresión testicular estacional es la permeabilidad de la barrera hemato-testicular (BTB), un complejo de uniones especializadas que define un compartimento adluminal y otro basal en el epitelio germinativo y preserva las células germinales meióticas y postmeióticas (situadas en el compartimento adluminal) de la acción

7. DISCUSIÓN

del sistema inmunitario (Kaur *et al.*, 2014; Stanton, 2016). Los cambios estacionales en la permeabilidad de la BTB se han comprobado mediante experimentos con trazadores moleculares en tres especies de mamíferos: el visón *Mustela vison* (Pelletier, 1988), el hámster ruso *Phodopus sungorus* (Tarulli *et al.*, 2008) y el topo ibérico *T. occidentalis* (Dadhich *et al.*, 2013). En todos ellos se demostró que la BTB pierde su impermeabilidad durante el proceso de regresión testicular. No pudimos realizar experimentos de rastreo molecular *in vivo* con los erizos incluidos en este estudio, pero el patrón de expresión desorganizado observado para CLDN11 en los testículos de los machos inactivos de esta especie se asemeja claramente a lo que describimos previamente en el topo, y sugiere que la BTB del testículo de *H. auritus* también se vuelve permeable durante la regresión estacional.

Tras la identificación de la descamación de las células germinales como el principal efector de la regresión testicular en el topo ibérico *T. occidentalis* (Dadhich *et al.*, 2013), este mecanismo se describió también en el gran armadillo peludo *C. villosus* (Luaces *et al.*, 2014, 2013). Aquí hemos puesto de manifiesto que este proceso celular también opera en el erizo orejudo *H. auritus*, sugiriendo así que podría ser relativamente común en los mamíferos. El proceso de regresión testicular de esta especie de erizo es similar al descrito para el topo, ya que incluye 1) la descamación masiva de las células germinales meióticas y postmeióticas, 2) la irrelevancia de la apoptosis durante la regresión, 3) la expresión desorganizada de las moléculas de adhesión celular, 4) el inicio persistente de la meiosis, 5) la apoptosis de los espermatoцитos en paquitene, y 6) la probable permeabilidad de la BTB. La única diferencia notable entre estas dos especies es reorganización del tejido intersticial durante la regresión testicular. En el topo, las células de Leydig forman una matriz celular densa y continua que ocupa la mayor parte del volumen testicular inactivo (Dadhich *et al.*, 2013), fenómeno que no se observa en el erizo. Por otro lado, el armadillo muestra algunas diferencias significativas con respecto al topo y al erizo. Tres rasgos principales son característicos en el armadillo pero no en las otras dos especies: 1) las células descamadas mueren posteriormente por apoptosis, 2) las células de Sertoli fagocitan las células germinales residuales en las últimas etapas de la regresión, y 3) el inicio de la meiosis está completamente abolido en el testículo inactivo.

7.2. RUTAS MOLECULARES ALTERADAS EN *MICROTUS DUODECIMCOSTATUS*

Refiriéndonos a las pocas especies de mamíferos estudiadas antes de 2013, sugerimos un posible origen filogenético para las diferencias entre especies señaladas en el proceso de regresión testicular, ya que las especies con mecanismos basados en la apoptosis (el hámster sirio *M. auratus* (Seco-Rovira *et al.*, 2014)) pertenecen al superorden Euarchontoglires, mientras que aquellas con regresión testicular no basada en la apoptosis (el corzo *C. capreolus* (Blottner *et al.*, 2007) y el topo ibérico *T. occidentalis* (Dadhich *et al.*, 2010)) pertenecen al superorden Laurasiateria (Dadhich *et al.*, 2013). Otras evidencias indican que tanto el gran armadillo peludo (Luaces *et al.*, 2014) como el erizo de orejas largas (presente trabajo), al igual que el topo (Dadhich *et al.*, 2013), presentan un proceso de regresión testicular basado en la descamación de las células germinales, y también pertenecen al superorden Laurasiateria. Además, tanto el topo como el erizo tienen un mecanismo de regresión testicular muy similar y pertenecen al orden Eulipotyphla, mientras que el armadillo, que presenta más diferencias a este respecto, pertenece al orden Cingulata. Por lo tanto, los datos actuales apoyan un origen filogenético para las diferencias entre clados observadas en el proceso de regresión testicular y sugieren que probablemente exista una alta tasa de variación para este proceso. Es necesario el estudio de un mayor número de especies para arrojar luz sobre esta cuestión.

7.2 Rutas moleculares alteradas en los testículos inactivos de *Microtus duodecimcostatus*

En los párrafos anteriores hemos puesto de manifiesto que existen muchas diferencias específicas de cada especie que hacen muy difícil establecer un mecanismo general de regresión testicular en mamíferos. En este contexto, el estudio de las diferencias a nivel de expresión génica entre testículos activos e inactivos en distintas especies ayudará a explicar qué mecanismos y rutas génicas se conservan, y cuáles son específicos de cada especie. Aquí presentamos el primer estudio exhaustivo de los transcriptomas de testículos activos e inactivos en una especie de mamífero, y hemos identificado varios procesos biológicos y rutas de señalización que se alteran durante la regresión testicular.

Como se esperaba, encontramos que los genes implicados en la

7. DISCUSIÓN

promoción de la espermatogénesis están preferentemente sobre-expresados en los testículos activos. Muchos de ellos se expresan en las células germinales y, como hemos mencionado anteriormente, es probable que esta sobre-expresión sea consecuencia de la diferente cantidad de células germinales que contienen ambos tipos de gónadas. Sin embargo, también encontramos marcadores de células de Sertoli implicados en la regulación de la espermatogénesis, como *SOX9* y *SOX8* (Barrionuevo *et al.*, 2016), *WT1* (Rao *et al.*, 2006) y *GATA4* (Chen *et al.*, 2015), que estaban sobre-expresados en los testículos inactivos. Previamente hemos demostrado que *SOX9* pierde su patrón de expresión dependiente del ciclo espermatogénico en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus*, hecho que también ocurre en los testículos inactivos del topo ibérico, *T. occidentalis*, donde también está sobre-expresado (Dadhich *et al.*, 2011). Dado que este factor de transcripción está implicado en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión celular (Barrionuevo *et al.*, 2016), puede tener un papel importante en el control de la espermatogénesis mediado por las células de Sertoli durante la reproducción estacional, regulando la expresión de moléculas implicadas en la formación y función del BTB.

Encontramos que las rutas de señalización MAPK/ERK1/2, WNT, TGF- β , Ca²⁺ citosólico y PI3K están desreguladas en el testículo inactivo de *M. duodecimcostatus*. Todas estas rutas operan en las células de Sertoli y están implicadas en la regulación de la espermatogénesis y en la dinámica de las uniones estrechas y adherentes presentes en la BTB (Ni *et al.*, 2019; Siu *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2008; Franchi y Camatini, 1985; Wong y Cheng, 2005; Xia *et al.*, 2006; Itman y Loveland, 2008; Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2019). Nuestro análisis demostró que MAPK/ERK1/2, una ruta de señalización necesaria para la proliferación celular mitótica y meiótica (Almog y Naor, 2008; Wong y Cheng, 2005; Wang *et al.*, 2019), desempeña un papel central en este proceso. Encontramos que 89 genes pertenecientes a la vía de señalización MAPK/ERK1/2 estaban sobre-regulados en los testículos inactivos (Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S4), y que muchos de estos genes también son compartidos por otras vías desreguladas (Figura 6.18), lo que indica que todas estas vías de señalización probablemente desempeñan papeles importantes en la regulación de la producción de gametos por parte de las células de Sertoli durante la reproducción estacional. Estudios

7.2. RUTAS MOLECULARES ALTERADAS EN *MICROTUS DUODECIMCOSTATUS*

anteriores han demostrado que la testosterona modula la actividad de la ruta de señalización MAPK/ERK en las células de Sertoli a través de una ruta no clásica del receptor de andrógenos (AR), como lo demuestra la activación de esta ruta tanto en un modelo de supresión de testosterona que resulta en el agotamiento de las células germinales (Wong y Cheng, 2005), como en células de Sertoli cultivadas en ratas estimuladas con testosterona (Fix *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007). Además, la testosterona también puede modular otras rutas como la concentración citosólica de Ca^{2+} en las células de Sertoli (Lyng *et al.*, 2000). En conjunto, estos datos indican que la disminución de los niveles séricos de testosterona en los machos inactivos de *M. duodecimcostatus* afecta a la regulación por parte de las células de Sertoli de varias rutas moleculares interconectadas que conducen a 1) alteraciones del ciclo espermatogénico, 2) desregulación de las moléculas de adhesión celular y 3) alteración de la dinámica de la BTB. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la ruta de señalización MAPK/ERK desempeña un papel central como mediador entre la señalización de la testosterona y la función de las células de Sertoli.

El testículo está sometido a un entorno inmunológico especial conocido como inmuno-privilegio que protege a las células germinales de un ataque autoinmune. Este inmuno-privilegio se basa en a) la formación de la BTB en el epitelio germinativo, b) la capacidad disminuida de la población de macrófagos testiculares para montar una respuesta inflamatoria y c) la expresión constitutiva de citoquinas antiinflamatorias por parte de las células inmunitarias y otras células somáticas (Fijak y Meinhardt, 2006; Li *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014). En condiciones fisiológicas normales, los macrófagos testiculares presentan una respuesta inflamatoria relativamente baja y unas propiedades inmunosupresoras elevadas en comparación con los macrófagos de otros tejidos, tal y como demuestra una capacidad reducida de sintetizar IL-1 β y TNF- α (Hayes *et al.*, 1996; Kern *et al.*, 1995). Nuestro análisis transcriptómico indicó que la población de macrófagos estaba activada en el testículo inactivo de *M. duodecimcostatus* (Figura 6.20) y 6.21). Además de los macrófagos, los linfocitos T que existen en los espacios intersticiales del testículo, incluyendo células T asesinas naturales (NK) y células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Tregs), también juegan un papel importante en la supresión inmunitaria. En particular esta última población celular (Tregs) tiene una potente acción inmunosupresora que contribuye

7. DISCUSIÓN

al entorno tolerogénico del testículo (Wheeler *et al.*, 2011). Nuestro análisis mostró que las células T también se activaron en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus* (Tabla Suplementaria *M. duodecimcostatus* S4). Por lo tanto, si consideramos estos resultados, junto con las observaciones de que 1) los niveles de testosterona se redujeron en los machos sexualmente inactivos de *M. duodecimcostatus*, 2) la testosterona induce una reducción de las citoquinas pro-inflamatorias en los macrófagos (incluyendo TNF- α) (D'Agostino *et al.*, 1999), 3) los genes pertenecientes a la vía del TNF y a la secreción de citoquinas estaban sobre-expresados en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus* (Figura 6.20 (Tablas Suplementarias *M. duodecimcostatus* S2 y S4), 4) la ruta de señalización del TNF inhibe la función inmunosupresora de las Tregs (Valencia *et al.*, 2006) y 5) la testosterona puede inducir un aumento del número de Tregs en los testículos (Fijak *et al.*, 2011), podemos concluir que los niveles reducidos de testosterona en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus* pueden inducir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos y, probablemente, por otros tipos de células somáticas (por ejemplo, Sertoli y células mioides peritubulares) que activan a los macrófagos y disminuyen la población de Tregs. En un estudio similar a este realizado en castores europeos, los autores también identificaron que los procesos inflamatorios estaban alterados en los testículos de inactivos (Bogacka *et al.*, 2017). Estos hechos, junto con la alteración de la BTB que tiene lugar en los testículos en regresión, probablemente conduzcan a la eliminación del inmuno-privilegio que opera en los testículos activos, necesario para el mantenimiento de la espermatogénesis y la fertilidad masculina (Fijak y Meinhardt, 2006; Zhao *et al.*, 2014). Nuestros resultados evidencian que el sistema inmunitario juega un papel importante durante la regresión testicular de los reproductores estacionales, aunque esta función apenas ha sido estudiada durante este proceso. Por lo tanto, futuros estudios dirigidos a desentrañar cómo varían los diferentes componentes del sistema inmune durante la regresión testicular de diferentes reproductores estacionales nos ayudarán a entender su papel en este proceso.

7.3 Rutas moleculares alteradas en los testículos inactivos de *Talpa occidentalis*

Anteriormente hemos estudiado los cambios que sufren los testículos de *T. occidentalis* a nivel histológico, inmunohistológico y hormonal (Dadhich *et al.*, 2010, 2011, 2013). Para profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a estos cambios, en el presente estudio hemos analizado el transcriptoma de los testículos en diferentes momentos del ciclo reproductivo de esta especie. Anteriormente hemos demostrado que, durante la época no reproductiva, los topos machos tienen niveles reducidos de testosterona en suero y testículos en regresión en los que la espermatogénesis está detenida, las moléculas de adhesión celular están desorganizadas y la BTB no es funcional (Dadhich *et al.*, 2013). En consonancia con esto, hemos encontrado que procesos biológicos como la “organización de la matriz extracelular” y el “ensamblaje de las uniones celulares”, así como varias rutas moleculares, incluyendo MAPK, ERK1/2, TGF- β , Ca²⁺ citosólico, PI3K, GTPasa y TNF que operan en las células de Sertoli y son necesarias para la espermatogénesis y la dinámica de las uniones estrechas y adherentes que forman la BTB, están alteradas en los testículos inactivos de *T. occidentalis*.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) comprenden una familia de reguladores involucrados en el control de muchos procesos fisiológicos (Sun *et al.*, 2015). Existen tres subfamilias clásicas de MAPKs, a) las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), b) las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs), y c) las MAPKs p38, y todas ellas han demostrado regular varios aspectos de la función testicular, incluyendo la división y diferenciación celular durante la espermatogénesis y la reestructuración de las uniones del epitelio germinativo (Sun *et al.*, 1999; Wong y Cheng, 2005; Ni *et al.*, 2019). La ruta MAPK/ERK1/2 desempeña un papel esencial en la modulación de la adhesión y la motilidad celular en varios epitelios, incluyendo la señalización mediada por la adhesión (Howe *et al.*, 2002), la dinámica del citoesqueleto (Stupack *et al.*, 2000) y el desacoplamiento de las uniones celulares (Wang *et al.*, 2004). En los testículos, los componentes de MAPK/ERK1/2 se encuentran en las células de Sertoli y en todas las clases de células germinales del epitelio seminífero (Wong y Cheng, 2005), y regulan la formación de

7. DISCUSIÓN

las uniones especializadas entre las células Sertoli y entre las células de Sertoli y la matriz extracelular que forman la BTB (Crépieux *et al.*, 2001, 2002). Esta cascada de MAPK también regula la formación de las especializaciones ectoplásmicas (ES), estructuras que contribuyen a la adhesión entre las células de Sertoli en la BTB, y entre las células de Sertoli y las espermatíidas en el compartimento adluminal (Sun *et al.*, 1999; Wong y Cheng, 2005; Ni *et al.*, 2019). Encontramos 96 y 82 genes desregulados pertenecientes a las vías MAPK y ERK1/2, respectivamente (Tabla Suplementaria *T. occidentalis*) S4, GO:0043405 y GO:0070371, y nuestro análisis de asociación “genes-categorías” indicó que muchos de estos genes desregulados son compartidos por estas dos vías y por otros procesos, incluyendo el ensamblaje y la regulación de las uniones celulares y la señalización mediada por AMPc (Figura 6.28). Como se ha mencionado anteriormente, la ruta MAPK también puede actuar a través de la cascada MAPK p38 (Engelberg, 2004). Esta subfamilia es activada por diferentes rutas, incluidas las GTPasas, que suelen dar lugar a respuestas inflamatorias o a la apoptosis. Se han encontrado miembros de la vía p38 MAPK en las células de Sertoli y en los espermatozoides alargados, y desempeñan un papel en el control de la dinámica de la unión celular en el epitelio seminífero (Wong y Cheng, 2005). En las células de Sertoli, esta ruta se activa en presencia de TGF- β 3, lo que conduce a una alteración de las proteínas de unión estrecha de la BTB (Lui *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004). Nuestro análisis transcriptómico también reveló que las vías del TGF- β y de la GTPasa están desreguladas en los testículos inactivos (Figura 6.28). Es probable que las diferentes cascadas MAPK actúen de forma concertada en la regulación de la dinámica de la BTB, lo que facilita la migración de las células germinales a lo largo del epitelio germinativo durante el ciclo espermatogénico (Wong y Cheng, 2005). Varias observaciones sugieren que estas rutas están reguladas hormonalmente: a) la testosterona puede estimular la señalización MAPK/ERK y provoca la fosforilación del factor de transcripción de la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc en la serina 133, una modificación que es necesaria para que las células de Sertoli promuevan la espermatogénesis (Fix *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007) y b) los bajos niveles de testosterona junto con el aumento de los niveles de TGF- β 3 conducen a la pérdida de moléculas de adhesión

7.3. RUTAS MOLECULARES ALTERADAS EN *TALPA OCCIDENTALIS*

celular en el epitelio seminífero, un proceso que parece estar mediado por diferentes cascadas MAPK (Xia *et al.*, 2005; Wong y Cheng, 2005). A la luz de todas estas observaciones, es concebible que los niveles reducidos de testosterona que sufre el topo ibérico durante el periodo no reproductivo conduzcan a la activación de diferentes cascadas de señalización MAPK en los testículos, que en concierto con otras rutas moleculares, incluyendo la señalización de AMPc, GTPasa, PI3-K y TGF- β , alteran la adhesión celular en el epitelio germinativo, conduciendo a la desorganización de la BTB y a la descamación masiva de células germinales, que es el principal mecanismo de regresión testicular en el topo ibérico.

Durante esta regresión testicular se altera la expresión y distribución de las moléculas de adhesión celular en el epitelio germinativo y las células de Sertoli pierden su función de sostén de las células germinales, así como la impermeabilidad de la BTB (Dadhich *et al.*, 2013). De acuerdo con estas observaciones, encontramos que procesos biológicos como la “organización de la matriz extracelular” y la “regulación del ensamblaje de las uniones celulares” están alterados en el transcriptoma de los testículos que están llevando a cabo el proceso de regresión, lo que indica que, en esta etapa, el epitelio seminífero comienza a perder su función de adhesión celular. La mayoría de los genes que se desregulan en este periodo siguen desregulados en etapas posteriores, durante el periodo no reproductivo, aunque a un nivel menos significativo. Entre ellos, encontramos genes implicados en la regulación de vías que controlan la adhesión celular como MAPK, ERK1/2, AMPc, GTPasa y TGF- β , indicando que la desregulación de estas rutas es el principal mecanismo molecular responsable de la descamación masiva de células germinales que acompaña a la regresión testicular estacional en el topo.

Nuestro análisis transcriptómico identificó procesos inmunológicos entre los que se incluyen “regulación de la respuesta inflamatoria”, la “activación de los macrófagos” y la “regulación de la respuesta al estímulo de las citoquinas”, así como rutas moleculares que regulan el sistema inmunitario, como NF-kappaB y TNF. Los genes pertenecientes a estas categorías estaban preferentemente sobre-expresados en los testículos inactivos (véanse los puntos azulados en la Figura 6.43), lo que denota la activación del sistema inmunitario en los testículos inactivos de *T. occidentalis*. Como hemos indicado anteriormente, en condiciones

7. DISCUSIÓN

fisiológicas normales, los macrófagos testiculares presentan una capacidad reducida para montar respuestas inflamatorias y producir citoquinas en comparación con los macrófagos de otros tejidos. Nuestros datos de RNA-seq revelaron la activación de la población de macrófagos en los testículos inactivos del topo ibérico (24 de los 33 DEGs pertenecientes a la categoría “activación de macrófagos” estaban sobre-expresado en testículos inactivos (Tablas Suplementarias *T. occidentalis* S4,6). Además, encontramos que la producción de citoquinas estaba estimulada en el testículo inactivo (40 de los 47 genes pertenecientes a la categoría “regulación de la respuesta al estímulo de citoquinas” estaban sobre-expresados en los testículos inactivos (Tablas Suplementarias *T. occidentalis* S4,6) y que TNF y NF-KappaB, dos rutas moleculares que cooperan en la regulación de la producción de citoquinas inflamatorias (Hayden y Ghosh, 2014) también estaban activadas en los testículos inactivos. Varios estudios evidencian un papel inmunosupresor de la testosterona sobre diferentes componentes del sistema inmunitario (Trigunaitė *et al.*, 2015; Foo *et al.*, 2017). De acuerdo con esto, la testosterona testicular induce una reducción de las citoquinas proinflamatorias en los macrófagos (D’Agostino *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1993). Teniendo en cuenta todas estas observaciones, sugerimos que, como ocurre en *M. duodecimcostatus*, los bajos niveles de testosterona en los testículos inactivos de *T. occidentalis* conducen a la pérdida del inmunoprivilegio del testículo activo, hecho que se manifiesta por la permeabilidad de la BTB y el aumento de la producción de citoquinas por parte de la población de macrófagos (y quizás de otras células somáticas). En conjunto, todos estos procesos podrían contribuir a mantener el estado de quiescencia de las gónadas de los topos durante el periodo no reproductivo.

También analizamos los niveles de expresión de genes pertenecientes a la “firma de expresión génica” de grupos espermatogénicos tempranos (Tabla Suplementaria *T. occidentalis* S11), y descubrimos que varios procesos biológicos están alterados en los testículos inactivos del topo ibérico, en particular la ubiquitinación de proteínas en la etapa de espermatogonia (Figura 6.38; Tablas Suplementarias *T. occidentalis* S12,13). La ubiquitinación es esencial para el establecimiento tanto de las células madre espermatogoniales como de las espermatogonias en diferenciación y también está implicada en la regulación de varios eventos clave durante la meiosis, incluyendo la recombinación homóloga y el silenciamiento de los

cromosomas sexuales (Bose *et al.*, 2014). De hecho, las mutaciones en la proteasa específica de la ubiquitina 26 (USP26), que se expresa en las células de Leydig y en las espermatogonias tempranas (Wosnitzer *et al.*, 2014), están asociadas a una espermatogénesis defectuosa y a la infertilidad tanto en humanos como en ratones (A Paduch *et al.*, 2005; Sakai *et al.*, 2019). La testosterona apoya la espermatogénesis a través de tres mecanismos: a) manteniendo la integridad de la BTB (Meng *et al.*, 2005), b) regulando la adhesión entre células de Sertoli y espermatidas (Holdcraft y Braun, 2004), y c) controlando la liberación de espermatozoides maduros (Holdcraft y Braun, 2004). Todas estas acciones están mediadas por las células de Sertoli, ya que las células germinales no expresan el receptor de andrógenos y, por tanto, no son dianas directas de la testosterona. En el presente estudio revelamos que la expresión génica parece estar alterada en las espermatogonias de los testículos de topes inactivos, aunque es difícil saber si esto se debe al entorno testicular de los testículos quiescentes, en el que tanto la BTB como la función de adhesión celular están comprometidos, o a mecanismos actualmente desconocidos que afectan directamente a la expresión de las células germinales, o a ambos.

7.4 Mecanismos moleculares conservados responsables de la regresión testicular de mamíferos con reproducción estacional

Por último, hemos comparado los datos de los transcriptomas testiculares del topo con los del topillo mediterráneo. Encontramos un gran número de genes que están desregulados en los testículos inactivos de ambas especies, con dos coincidencias notables: 1) muchos de estos genes están implicados en el control de la adhesión celular (Figuras 6.41 y 6.42; Tablas Suplementarias *T. occidentalis* S14,15) y, de acuerdo con esto, se desregulan vías moleculares como MAPK, ERK1/2, TGF- β , GTPasa y TNF, que controlan las uniones celulares en el epitelio germinativo y 2) también encontramos un conjunto compartido de genes implicados en la regulación de la respuesta inmune (Figuras 6.41 y 6.43; Tablas Suplementarias *T. occidentalis* S14,15). Estas coincidencias son relevantes si tenemos en cuenta que los testículos inactivos de estas dos especies

7. DISCUSIÓN

no presentan características idénticas. Por ejemplo, la iniciación de la meiosis por parte de las espermatogonias está completamente abolida en los testículos inactivos de *M. duodecimcostatus* (Lao-Pérez *et al.*, 2021), pero no en los de *T. occidentalis*, donde las células germinales entran en meiosis y la espermatogénesis progresa hasta los primeros estadios de espermatoцитos primarios (Dadhich *et al.*, 2010, 2013). Además, los túbulos seminíferos inactivos de *M. duodecimcostatus* permanecen adyacentes entre sí (Lao-Pérez *et al.*, 2021), mientras que los de *T. occidentalis* se separan ampliamente por la interposición de las células de Leydig (Dadhich *et al.*, 2010, 2013). A pesar de estas diferencias, aquí hemos encontrado que dos importantes funciones testiculares, la adhesión celular y la respuesta inmune, están desreguladas en los testículos inactivos de estas dos especies, lo que sugiere que existen mecanismos moleculares conservados asociados a la regresión testicular estacional en los mamíferos. Por lo tanto, deberían realizarse estudios similares en otras especies para comprobar esta hipótesis.

8. Conclusiones

1. Como ocurre en otras localizaciones, en el norte de Egipto, el erizo orejudo *Hemiechinus auritus* se reproduce a finales de la primavera y durante el verano, mientras que en otoño e invierno permanece sexualmente inactivo.
2. Durante el periodo reproductivo, la masa testicular media de *H. auritus* es tres veces superior a la del periodo inactivo. Los testículos inactivos muestran una fuerte reducción de los túbulos seminíferos en los que no se observan las etapas finales del ciclo espermatogénico.
3. En los testículos inactivos de *H. auritus* algunas células germinales alcanzan el estadio de paquitene, pero son eliminadas mediante apoptosis.
4. En los testículos en regresión de *H. auritus* la apoptosis no explica la eliminación masiva de células germinales que se produce durante este periodo.
5. En cambio, la presencia anómala de espermatoцитos primarios y secundarios en el lumen de los túbulos seminíferos y del epidídimo en los testículos en regresión de *H. auritus* indica que la descamación es el principal mecanismo de eliminación de células germinales.
6. La adhesión entre las células de Sertoli y entre las células de Sertoli y las células germinales está comprometida en los testículos en regresión de *H. auritus*, explicando así el desprendimiento de células germinales que tiene lugar durante este periodo.
7. Al igual que ocurre en todas las especies estudiadas hasta la fecha, los niveles de testosterona circulantes están reducidos en los

8. CONCLUSIONES

individuos inactivos de *H. auritus*, indicando que la reducción de la concentración de andrógenos es probablemente la señal hormonal que induce la eliminación estacional de las células germinales y la pérdida de la adhesión celular en el epitelio germinativo de mamíferos.

8. Tanto en *Microtus duodecimcostatus* como en *Talpa occidentalis* existen varias rutas moleculares incluyendo MAPK, ERK1/2, TGF- β , Ca²⁺ citosólico y PI3K, que parecen ser responsables de la pérdida de adhesión celular que tiene lugar en el epitelio germinativo del testículo inactivo.
9. Tanto en *M. duodecimcostatus* como en *T. occidentalis* el testículo inactivo pierde el inmuno-privilegio que normalmente está presente en un testículo funcional. Esta pérdida probablemente sea consecuencia de los bajos niveles de testosterona circulante en los machos durante el periodo no reproductiva.
10. El gen *SOX9* está desregulado en los testículos inactivos tanto de *M. duodecimcostatus* como de *T. occidentalis*. Dado su papel esencial en el control de la expresión de proteínas de adhesión celular en las células de Sertoli, este gen puede jugar un papel importante en el control de la regresión testicular.
11. Durante el proceso de regresión testicular de *T. occidentalis* se alteran inicialmente ciertas rutas génicas implicadas en el control de la adhesión celular, lo que puede explicar a nivel molecular como se produce la descamación masiva de células germinales que tiene lugar en este periodo.
12. La expresión de numerosos genes, en especial los relacionados con la ubiquitinación de proteínas, parece estar alterada en las espermatogonias de los testículos de topos inactivos. Es difícil saber si esto se debe al entorno testicular de los testículos quiescentes, a mecanismos actualmente desconocidos que afectan directamente a la expresión de las células germinales, o a ambos.
13. La comparación de los transcriptomas de *M. duodecimcostatus* y de *T. occidentalis* revela que hay más de 1500 genes que están desregulados en los testículos inactivos de ambas especies. Esos

genes están enriquecidos en procesos biológicos relacionados con la adhesión celular y la respuesta inmune, lo que sugiere que existen mecanismos moleculares conservados asociados a la regresión testicular estacional de los mamíferos.

14. Tras el estudio de varios mamíferos con reproducción estacional es evidente que no existe un mecanismo único de regresión testicular. Se han identificado dos procesos celulares principales por los que se eliminan masivamente las células germinales: la apoptosis y la descamación de células germinales. Sin embargo, deben estudiarse más especies para determinar la prevalencia relativa de cada uno de estos procesos celulares, y, tal vez, descubrir nuevos mecanismos de regresión testicular.

8. CONCLUSIONES

9. Conclusions

1. As observed in other locations, in northern Egypt the reproduction of the long eared hedgehog *Hemiechinus auritus* takes place in late spring and summer, while in autumn and winter it remains reproductively inactive.
2. During the reproductive period, the average testicular mass of *H. auritus* is three times higher than during the non-reproductive period. Inactive testes show a strong reduction of the seminiferous tubules, in which the final stages of the spermatogenic cycle are completely absent.
3. In the inactive testes of *H. auritus*, some germ cells reach the pachytene stage but they are then eliminated mainly by apoptosis.
4. In the regressing testis of *H. auritus*, apoptosis does not explain the massive depletion of germ cells that occurs during this period.
5. In contrast, the abnormal presence of primary and secondary spermatocytes in the lumen of the seminiferous tubules and epididymis of the *H. auritus* regressing testis indicates that desquamation is the main mechanism of germ cell depletion.
6. Adhesion between Sertoli cells and between Sertoli and germ cells is compromised in the *H. auritus* regressing testis, thus explaining the germ cell desquamation that occurs during this period.
7. As in all species studied to date, circulating testosterone levels are reduced in inactive individuals of *H. auritus*, indicating that reduced androgen concentration is probably the hormonal signal that induces seasonal germ cell depletion and loss of cell adhesion in the mammalian germ cell epithelium.

9. CONCLUSIONS

8. In both *Microtus duodecimcostatus* and *Talpa occidentalis*, there are several molecular pathways including MAPK, ERK1/2, TGF- β , cytosolic Ca²⁺ and PI3K, whose deregulation seems to be responsible for the loss of cell adhesion that occurs in the germinal epithelium of the inactive testis.
9. In both *M. duodecimcostatus* and *T. occidentalis*, the inactive testis loses the immuno-privilege that normally operates in functional testes. This loss is probably a consequence of the low levels of circulating testosterone in males during the non-reproductive season.
10. The *SOX9* gene is downregulated in the quiescent testes of both *M. duodecimcostatus* and *T. occidentalis*. Given its essential role in controlling the expression of cell adhesion proteins in Sertoli cells, this gene may play an important role in the control of mammalian testis regression.
11. During the process of testicular regression in *T. occidentalis*, genetic pathways involved in the control of cell adhesion are initially altered, which may explain at the molecular level the massive depletion of germ cells that takes place during this period.
12. The expression of many genes, especially those related to protein ubiquitination, are altered in the spermatogonia of inactive mole testes. It is difficult to know if this is due to the testicular environment of the quiescent testis, to currently unknown mechanisms directly affecting germ cell expression, or both.
13. The results of comparing the transcriptomes of *M. duodecimcostatus* and *T. occidentalis* reveals that there are over 1500 genes that are deregulated in the inactive testes of both species. These genes are enriched in biological processes related to cell adhesion and immune response, suggesting that there are conserved molecular mechanisms associated with seasonal testicular regression in mammals.
14. From the study of several seasonally reproducing mammals, it is clear that there is no single mechanism of testicular regression. Two main cellular processes by which germ cells are massively depleted have been identified: apoptosis and germ cell desquamation. However,

more species need to be studied to determine the relative prevalence of each of these cellular processes, and perhaps to discover new mechanisms of testicular regression.

9. CONCLUSIONS

10. Material suplementario

En el siguiente enlace pueden visualizarse y/o descargarse las tablas suplementarias que se referencian en la presente tesis:

http://sl.ugr.es/Tesis_Mlao

10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Bibliografía

- A Paduch D., Mielnik A. y Schlegel P.N. (2005) Novel mutations in testis-specific ubiquitin protease 26 gene may cause male infertility and hypogonadism. *Reproductive BioMedicine Online*, **10**:747–754. ISSN 1472-6483.
- Adams M.R., Tamarin R.H. y Callard I.P. (1980) Seasonal changes in plasma androgen levels and the gonads of the beach vole, *Microtus breweri*. *General and comparative endocrinology*, **41**:31–40.
- Allan D.J., Gobé G.C. y Harmon B.V. (1988) Sertoli cell death by apoptosis in the immature rat testis following x-irradiation. *Scanning microscopy*, **2**:503–512.
- Almog T. y Naor Z. (2008) Mitogen activated protein kinases (mapks) as regulators of spermatogenesis and spermatozoa functions. *Molecular and cellular endocrinology*, **282**:39–44. ISSN 0303-7207.
- Andersen Berg K., Wiger R., Dahl E., Torp T., Farstad W., Krogenaes A., McNeilly A.S., Paulenz H. y Ropstad E. (2001) Seasonal changes in spermatogenic activity and in plasma levels of fsh, lh and testosterone, and the effect of immunization against inhibin in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *International journal of andrology*, **24**:284–294.
- Asawa S.C. y Mathur R.S. (1982) Quantitative evaluation of the interrelationship of certain endocrine glands of *Hemichinus auritus collaris* (gray) during the reproductive cycle. *Acta anatomica*, **111**:259–267.
- Balda M.S., Gonzalez-Mariscal L., Matter K., Cereijido M. y Anderson J.M. (1993) Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *The Journal of cell biology*, **123**:293–302.
- Balda M.S., González-Mariscal L., Contreras R.G., Macias-Silva M., Torres-Marquez M.E., García-Sáinz J.A. y Cereijido M. (1991) Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of g-proteins, phospholipase c, protein kinase c and calmodulin. *The Journal of membrane biology*, **122**:193–202.
- Bansode F.W., Chowdhury S.R. y Dhar J.D. (2003) Seasonal changes in the seminiferous epithelium of rhesus and bonnet monkeys. *Journal of medical primatology*, **32**:170–177.
- Barrell G.K., Moenter S.M., Caraty A. y Karsch F.J. (1992) Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biology of reproduction*, **46**:1130–1135.
- Barrionuevo F., Bagheri-Fam S., Klattig J., Kist R., Taketo M.M., Englert C. y

BIBLIOGRAFÍA

- Scherer G. (2006) Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete xy sex reversal in mice. *Biology of reproduction*, **74**:195–201.
- Barrionuevo F., Georg I., Scherthan H., Lécureuil C., Guillou F., Wegner M. y 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.
- Barrionuevo F.J., Hurtado A., Kim G.J., Real F.M., Bakkali M., Kopp J.L., Sander M., Scherer G., Burgos M. y Jiménez R. (2016) *Sox9* and *Sox8* protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *eLife*, **5**.
- Barrionuevo F.J., Zurita F., Burgos M. y Jiménez R. (2004) Testis-like development of gonads in female moles. new insights on mammalian gonad organogenesis. *Developmental biology*, **268**:39–52.
- Bartness T.J., Powers J.B., Hastings M.H., Bittman E.L. y Goldman B.D. (1993) The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *Journal of pineal research*, **15**:161–190.
- Batias C., Defamie N., Lablack A., Thepot D., Fenichel P., Segretain D. y Pointis G. (1999) Modified expression of testicular gap-junction *connexin 43* during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell and tissue research*, **298**:113–121.
- Bellgrau D., Gold D., Selawry H., Moore J., Franzusoff A. y Duke R.C. (1995) A role for cd95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*, **377**:630–632.
- Bellve A. y O'Brien D. (1983) The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. *Mechanism and control of animal fertilization*, pp. 55–137.
- Beltrán-Frutos E., Seco-Rovira V., Ferrer C., Madrid J.F., Sáez F.J., Canteras M. y Pastor L.M. (2016) Cellular changes in the hamster testicular interstitium with ageing and after exposure to short photoperiod. *Reproduction, fertility, and development*, **28**:838–851.
- Benten W.P., Lieberherr M., Giese G., Wrehlke C., Stamm O., Sekeris C.E., Mossmann H. y Wunderlich F. (1999) Functional testosterone receptors in plasma membranes of t cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **13**:123–133.
- Bertoldo M.J., Guibert E., Faure M., Guillou F., Ramé C., Nadal-Desbarats L., Foretz M., Viollet B., Dupont J. y Froment P. (2016) Specific deletion of amp-activated protein kinase (α 1ampk) in mouse sertoli cells modifies germ cell quality. *Molecular and cellular endocrinology*, **423**:96–112.
- Bhardwaj R.S., Schwarz A., Becher E., Mahnke K., Aragane Y., Schwarz T. y Luger T.A. (1996) Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce il-10 production in human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **156**:2517–2521.
- Bittman E.L. y Goldman B.D. (1979) Serum levels of gonadotrophins in hams-

- ters exposed to short photoperiods: effects of adrenalectomy and ovariectomy. *The Journal of endocrinology*, **83**:113–118.
- Blanco-Rodríguez J. y Martínez-García C. (1996a) Induction of apoptotic cell death in the seminiferous tubule of the adult rat testis: assessment of the germ cell types that exhibit the ability to enter apoptosis after hormone suppression by oestradiol treatment. *International journal of andrology*, **19**:237–247.
- Blanco-Rodríguez J. y Martínez-García C. (1996b) Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell proliferation*, **29**:13–31.
- Blanco-Rodríguez J. y Martínez-García C. (1998) Apoptosis precedes detachment of germ cells from the seminiferous epithelium after hormone suppression by short-term oestradiol treatment of rats. *International journal of andrology*, **21**:109–115.
- Blottner S., Hingst O. y Meyer H.H. (1995) Inverse relationship between testicular proliferation and apoptosis in mammalian seasonal breeders. *Theriogenology*, **44**:321–328.
- Blottner S., Hingst O. y Meyer H.H. (1996) Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of reproduction and fertility*, **108**:299–305.
- Blottner S., Schön J. y Roelants H. (2007) Apoptosis is not the cause of seasonal testicular involution in roe deer. *Cell and tissue research*, **327**:615–624.
- Bogacka I., Paukszto u., Jastrzębski J.P., Czerwińska J., Chojnowska K., Kamińska B., Kurzyńska A., Smolińska N., Giżejowski Z. y Kamiński T. (2017) Seasonal differences in the testicular transcriptome profile of free-living european beavers (castor fiber l.) determined by the rna-seq method. *PloS one*, **12**:e0180323. ISSN 1932-6203.
- Bose R., Manku G., Culty M. y Wing S.S. (2014) Ubiquitin–Proteasome System in Spermatogenesis. In P. Sutovsky, ed., *Posttranslational Protein Modifications in the Reproductive System*, Advances in Experimental Medicine and Biology, pp. 181–213. Springer, New York, NY. ISBN 978-1-4939-0817-2.
- Brauchi S., Rauch M.C., Alfaro I.E., Cea C., Concha I.I., Benos D.J. y Reyes J.G. (2005) Kinetics, molecular basis, and differentiation of l-lactate transport in spermatogenic cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, **288**:C523–C534.
- Brinkworth M.H., Weinbauer G.F., Schlatt S. y Nieschlag E. (1995) Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *Journal of reproduction and fertility*, **105**:25–33.
- Bronson F.H. (1985) Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biology of reproduction*, **32**:1–26.
- Bronson F.H. (1988) Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. *Reproduction, nutrition, developpement*, **28**:335–347.
- Bryant D.M., Johnson K., DiTommaso T., Tickle T., Couger M.B., Payzin-Dogru D., Lee T.J., Leigh N.D., Kuo T.H., Davis F.G., Bateman J., Bryant S., Guzikowski A.R., Tsai S.L., Coyne S., Ye

BIBLIOGRAFÍA

- W.W., Freeman R.M., Peshkin L., Tabin C.J., Regev A., Haas B.J. y Whited J.L. (2017) A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell reports*, **18**:762–776.
- Cadigan K.M. y Nusse R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & development*, **11**:3286–3305.
- Chapman D.L. y 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.
- Chen S.R., Tang J.X., Cheng J.M., Li J., Jin C., Li X.Y., Deng S.L., Zhang Y., Wang X.X. y 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.
- Cheng C.Y. y Mruk D.D. (2012) The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, **64**:16–64.
- Cheng J., Watkins S.C. y Walker W.H. (2007) Testosterone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase via Src Kinase and the Epidermal Growth Factor Receptor in Sertoli Cells. *Endocrinology*, **148**:2066–2074. ISSN 0013-7227.
- Citi S. (1992) Protein kinase inhibitors prevent junction dissociation induced by low extracellular calcium in mdck epithelial cells. *The Journal of cell biology*, **117**:169–178.
- Cohen J.J. (1999) Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **103**:548–554.
- Conaway C.H. y D S S.A.D.E. (1965) The seasonal spermatogenic cycle in free ranging *Rhesus monkeys*. *Folia primatologica; international journal of primatology*, **3**:1–12.
- Connor F., Bertwistle D., Mee P.J., Ross G.M., Swift S., Grigorieva E., Tybulewicz V.L. y Ashworth A. (1997) Tumorigenesis and a dna repair defect in mice with a truncating *Brca2* mutation. *Nature genetics*, **17**:423–430.
- Costa R.R. y Varanda W.A. (2007) Intracellular calcium changes in mice leydig cells are dependent on calcium entry through t-type calcium channels. *The Journal of physiology*, **585**:339–349.
- Cotilla I. y Palomo L. (2007) *Microtus decimcostatus* (de Selys-Longchamps, 1839). *Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España*.
- Crisóstomo L., Alves M.G., Gorga A., Sousa M., Riera M.F., Galardo M.N., Meroni S.B. y Oliveira P.F. (2018) Molecular mechanisms and signaling pathways involved in the nutritional support of spermatogenesis by sertoli cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **1748**:129–155.
- Crépieux P., Marion S., Martinat N., Fafeur V., Vern Y.L., Kerboeuf D., Guillou F. y Reiter E. (2001) The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene*, **20**:4696–4709. ISSN 1476-5594.

- Crépieux P., Martinat N., Marion S., Guillou F. y Reiter E. (2002) Cellular Adhesion of Primary Sertoli Cells Affects Responsiveness of the Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 to Follicle-Stimulating Hormone but Not to Epidermal Growth Factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **399**:245–250. ISSN 0003-9861.
- Cyr D.G., Gregory M., Dubé E., Dufresne J., Chan P.T.K. y Hermo L. (2007) Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian journal of andrology*, **9**:463–475.
- Dadhich R.K., Barrionuevo F.J., Lupiáñez D.G., Real F.M., Burgos M. y Jiménez R. (2011) Expression of genes controlling testicular development in adult testis of the seasonally breeding iberian mole. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, **5**:77–88.
- Dadhich R.K., Barrionuevo F.J., Real F.M., Lupiáñez D.G., Ortega E., Burgos M. y 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.
- Dadhich R.K., Real F.M., Zurita F., Barrionuevo F.J., Burgos M. y Jiménez R. (2010) Role of apoptosis and cell proliferation in the testicular dynamics of seasonal breeding mammals: a study in the iberian mole, *Talpa occidentalis*. *Biology of reproduction*, **83**:83–91.
- D'Agostino P., Milano S., Barbera C., Di Bella G., La Rosa M., Ferlazzo V., Farruggio R., Miceli D.M., Miele M., Castagnetta L. y Cillari E. (1999) Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **876**:426–429. ISSN 0077-8923.
- Dal Secco V., Riccioli A., Padula F., Ziparo E. y Filippini A. (2008) Mouse sertoli cells display phenotypical and functional traits of antigen-presenting cells in response to interferon gamma. *Biology of reproduction*, **78**:234–242.
- Dardente H., Lomet D., Robert V., Decourt C., Beltramo M. y Pellicer-Rubio M.T. (2016) Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*, **86**:324–332.
- De Gendt K., Swinnen J.V., Saunders P.T.K., Schoonjans L., Dewerchin M., Devos A., Tan K., Atanassova N., Claessens F., Lécureuil C., Heyns W., Carmeliet P., Guillou F., Sharpe R.M. y Verhoeven G. (2004) A sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**:1327–1332.
- DeFalco T., Potter S.J., Williams A.V., Waller B., Kan M.J. y Capel B. (2015) Macrophages contribute to the spermatogonial niche in the adult testis. *Cell reports*, **12**:1107–1119.
- Dent P., Yacoub A., Fisher P.B., Hagan M.P. y Grant S. (2003) Mapk pathways in radiation responses. *Oncogene*, **22**:5885–5896.
- Dieckman L.M. y Washington M.T. (2013) PcnA trimer instability inhibits transle-

BIBLIOGRAFÍA

- sion synthesis by dna polymerase. *DNA repair*, **12**:367–376.
- Duckett R.J., Hedger M.P., McLachlan R.I. y Wreford N.G. (1997) The effects of gonadotropin-releasing hormone immunization and recombinant follicle-stimulating hormone on the leydig cell and macrophage populations of the adult rat testis. *Journal of andrology*, **18**:417–423.
- Dym M. y 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.
- Engelberg D. (2004) Stress-activated protein kinases-tumor suppressors or tumor initiators? *Seminars in cancer biology*, **14**:271–282. ISSN 1044-579X.
- Fallarino F., Luca G., Calvitti M., Mancuso F., Nastruzzi C., Fioretti M.C., Grohmann U., Becchetti E., Burgevin A., Kratzer R., van Endert P., Boon L., Puccetti P. y Calafiore R. (2009) Therapy of experimental type 1 diabetes by isolated sertoli cell xenografts alone. *The Journal of experimental medicine*, **206**:2511–2526.
- Fijak M. y Meinhardt A. (2006) The testis in immune privilege. *Immunological reviews*, **213**:66–81. ISSN 0105-2896.
- Fijak M., Schneider E., Klug J., Bhushan S., Hackstein H., Schuler G., Wygrecka M., Gromoll J. y Meinhardt A. (2011) Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory t cell expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **186**:5162–5172. ISSN 1550-6606.
- Fix C., Jordan C., Cano P. y Walker W.H. (2004) Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *PNAS*, **101**:10919–10924. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- Florin A., Maire M., Bozec A., Hellani A., Chater S., Bars R., Chuzel F. y Benahmed M. (2005) Androgens and post-meiotic germ cells regulate *claudin-11* expression in rat sertoli cells. *Endocrinology*, **146**:1532–1540.
- Flower M.S.S. (1932) Notes on the recent mammals of egypt, with a list of the species recorded from that kingdom. In *Proceedings of the zoological Society of London*, pp. 369–450. Wiley Online Library.
- Foo Y.Z., Nakagawa S., Rhodes G. y Simmons L.W. (2017) The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. *Biological Reviews*, **92**:551–571. ISSN 1469-185X.
- Fowler P.A. (1988) Seasonal endocrine cycles in the european hedgehog, *Erinaceus europaeus*. *Journal of reproduction and fertility*, **84**:259–272.
- Franchi E. y Camatini M. (1985) Evidence that a ca^{+2} chelator and a calmodulin blocker interfere with the structure of inter-sertoli junctions. *Tissue & cell*, **17**:13–25. ISSN 0040-8166.
- Fröjdman K., Harley V.R. y Pelliniemi L.J. (2000) *Sox9* protein in rat sertoli cells is age and stage dependent. *Histochemistry and cell biology*, **113**:31–36.
- Furuta I., Porkka-Heiskanen T., Scarbrough K., Tapanainen J., Turek F.W.

- y Hsueh A.J. (1994) Photoperiod regulates testis cell apoptosis in djungarian hamsters. *Biology of reproduction*, **51**:1315–1321.
- Fuster M.J.L. (1985) The natural communities of small mammals (insectivores and rodents) of catalonia (spain). *Miscel·lània Zoològica*, pp. 375–387.
- Galardo M.N., Riera M.F., Pellizzari E.H., Cigorraga S.B. y Meroni S.B. (2007) The amp-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribo-nucleoside, regulates lactate production in rat sertoli cells. *Journal of molecular endocrinology*, **39**:279–288.
- Galardo M.N., Riera M.F., Pellizzari E.H., Sobarzo C., Scarcelli R., Denduchis B., Lustig L., Cigorraga S.B. y Meroni S.B. (2010) Adenosine regulates sertoli cell function by activating ampk. *Molecular and cellular endocrinology*, **330**:49–58.
- Gao Y. y Lui W.Y. (2014) Synergistic effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on coxsackievirus and adenovirus receptor expression: an explanation of cell sloughing during testicular inflammation in mice. *Biology of reproduction*, **90**:59.
- Goldman B.D. (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of biological rhythms*, **16**:283–301.
- Gonzalo-Gil E. y Galindo-Izquierdo M. (2014) Role of transforming growth factor-beta (tgf) beta in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Reumatologia clinica*, **10**:174–179.
- González C.R., Muscársel Isla M.L. y Vitullo A.D. (2018) The balance between apoptosis and autophagy regulates testis regression and recrudescence in the seasonal-breeding south american plains vizcacha, *Lagostomus maximus*. *PloS one*, **13**:e0191126.
- Goodman R.L., Bittman E.L., Foster D.L. y Karsch F.J. (1982) Alterations in the control of luteinizing hormone pulse frequency underlie the seasonal variation in estradiol negative feedback in the ewe. *Biology of reproduction*, **27**:580–589.
- Gorczyńska E. y Handelsman D.J. (1995) Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in sertoli cells. *Endocrinology*, **136**:2052–2059.
- Gorczyńska-Fjälling E. (2004) The role of calcium in signal transduction processes in sertoli cells. *Reproductive biology*, **4**:219–241. ISSN 1642-431X.
- Gow A., Southwood C.M., Li J.S., Pariali M., Riordan G.P., Brodie S.E., Danias J., Bronstein J.M., Kachar B. y Lazzarini R.A. (1999) Cns myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell*, **99**:649–659.
- Goyal R.P. y Mathur R.S. (1974) Certain biochemical observations on the testes and male sex accessory glands of two insectivores, *Suncus murinus sindensis* Anderson and *Hemiechinus auritus collaris* Gray. *Acta anatomica*, **90**:462–466.
- Grabbe S., Bhardwaj R.S., Mahnke K., Simon M.M., Schwarz T. y Luger T.A. (1996) alpha-melanocyte-stimulating hormone induces hapten-specific tolerance in mice. *Journal of*

BIBLIOGRAFÍA

- immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **156**:473–478.
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N. y Regev A. (2011) Full-length transcriptome assembly from rna-seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, **29**:644–652.
- Green C.D., Ma Q., Manske G.L., Shami A.N., Zheng X., Marini S., Moritz L., Sultan C., Gurczynski S.J., Moore B.B., Tallquist M.D., Li J.Z. y Hammoud S.S. (2018) A comprehensive roadmap of murine spermatogenesis defined by single-cell rna-seq. *Developmental cell*, **46**:651–667.e10.
- Gregory M. y Cyr D.G. (2006) Identification of multiple claudins in the rat epididymis. *Molecular reproduction and development*, **73**:580–588.
- Guth S.I.E. y Wegner M. (2008) Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **65**:3000–3018.
- Haagmans B.L., Hoogerbrugge J.W., Themmen A.P.N. y Teerds K.J. (2003) Rat testicular germ cells and sertoli cells release different types of bioactive transforming growth factor beta in vitro. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, **1**:3.
- Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., MacManes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., LeDuc R.D., Friedman N. y Regev A. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from rna-seq using the trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols*, **8**:1494–1512.
- Hamer G., Novak I., Kouznetsova A. y Höög C. (2008) Disruption of pairing and synapsis of chromosomes causes stage-specific apoptosis of male meiotic cells. *Theriogenology*, **69**:333–339.
- Hata A.N. y Breyer R.M. (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & therapeutics*, **103**:147–166.
- Hayden M.S. y Ghosh S. (2014) Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*, **26**:253–266. ISSN 1044-5323.
- Hayes F.J., Pitteloud N., DeCruz S., Crowley W.F. y Boepple P.A. (2001) Importance of inhibin b in the regulation of fsh secretion in the human male. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **86**:5541–5546.
- Hayes R., Chalmers S.A., Nikolic-Paterson D.J., Atkins R.C. y Hedger M.P. (1996) Secretion of bioactive interleukin 1 by rat testicular macrophages in vitro. *Journal of andrology*, **17**:41–49. ISSN 0196-3635.
- Hedger M.P. (2002) Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *Journal of reproductive immunology*, **57**:19–34.

- Heldstab S.A. (2021) Latitude, life history and sexual size dimorphism correlate with reproductive seasonality in rodents. *Mammal Review*, **51**:256–271.
- Hermann B.P., Cheng K., Singh A., Roa-De La Cruz L., Mutoji K.N., Chen I.C., Gildersleeve H., Lehle J.D., Mayo M., Westernströer B., Law N.C., Oatley M.J., Velte E.K., Niedenberger B.A., Fritze D., Silber S., Geyer C.B., Oatley J.M. y McCarrey J.R. (2018) The mammalian spermatogenesis single-cell transcriptome, from spermatogonial stem cells to spermatids. *Cell reports*, **25**:1650–1667.e8.
- Hikim A.P., Bartke A.J. y Russell L.D. (1988) The seasonal breeding hamster as a model to study structure-function relationships in the testis. *Tissue & cell*, **20**:63–78.
- Hingst O. y Blottner S. (1995) Quantification of apoptosis (programmed cell death) in mammalian testis by dna-fragmentation elisa. *Theriogenology*, **44**:313–319.
- Hoffer A.P. y Hinton B.T. (1984) Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biology of reproduction*, **30**:991–1004.
- Hogarth C.A., Arnold S., Kent T., Mitchell D., Isoherranen N. y Griswold M.D. (2015) Processive pulses of retinoic acid propel asynchronous and continuous murine sperm production. *Biology of reproduction*, **92**:37.
- Hogarth C.A. y Griswold M.D. (2010) The key role of vitamin a in spermatogenesis. *The Journal of clinical investigation*, **120**:956–962.
- Holdcraft R.W. y Braun R.E. (2004) Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*, **131**:459–467. ISSN 0950-1991.
- Howe A.K., Aplin A.E. y Juliano R.L. (2002) Anchorage-dependent ERK signaling – mechanisms and consequences. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12**:30–35. ISSN 0959-437X.
- Iosub R., Klug J., Fijak M., Schneider E., Fröhlich S., Blumbach K., Wenne-muth G., Sommerhoff C.P., Steinhoff M. y Meinhardt A. (2006) Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2. *The Journal of pathology*, **208**:686–698.
- Islam M.N., Tsukahara N. y Sugita S. (2012) Apoptosis-mediated seasonal testicular regression in the japanese jungle crow (*Corvus macrorhynchos*). *Theriogenology*, **77**:1854–1865. ISSN 1879-3231.
- Itman C. y Loveland K.L. (2008) SMAD expression in the testis: An insight into BMP regulation of spermatogenesis. *Dev. Dyn.*, **237**:97–111. ISSN 10588388, 10970177.
- Jégou B. (1993) The sertoli-germ cell communication network in mammals. *International review of cytology*, **147**:25–96.
- Jiménez R., Burgos M., Sánchez A. y Diaz De La Guardia R. (1990) The reproductive cycle of *Talpa occidentalis* in the southeastern iberian peninsula. *Acta Theriologica*, **35**:165–169.
- Jiménez R., Alarcón F.J., Sánchez A., Burgos M. y De La Guardia R.D. (1996)

BIBLIOGRAFÍA

- Ovotestis variability in young and adult females of the mole *Talpa occidentalis* (insectivora, mammalia). *The Journal of experimental zoology*, **274**:130–137.
- Jiménez R., Burgos M. y Barrionuevo F.J. (2015) Circannual testis changes in seasonally breeding mammals. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, **9**:205–215.
- Jiménez R., Burgos M., Sánchez A. y Díaz de la Guardia R. (1990) Synaptonemal complex analysis of spermatocytes of *Talpa occidentalis* (insectivora, mammalia): autosomal synapsis and substaging of zygonema and pachynema. *Cytogenetics and cell genetics*, **53**:97–102.
- Jiménez R., Burgos M., Sánchez A., Sinclair A.H., Alarcón F.J., Marín J.J., Ortega E. y Díaz de la Guardia R. (1993) Fertile females of the mole *Talpa occidentalis* are phenotypic intersexes with ovotestes. *Development (Cambridge, England)*, **118**:1303–1311.
- Johnson G.L. y Lapadat R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by erk, jnk, and p38 protein kinases. *Science (New York, N. Y.)*, **298**:1911–1912.
- Johnson L. (1985) Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. *Biology of reproduction*, **32**:1181–1190.
- Johnson L. (1986) Spermatogenesis and aging in the human. *Journal of andrology*, **7**:331–354.
- Johnson L. (1991) Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biology of reproduction*, **44**:284–291.
- Johnson L., Matt K.S., Bartke A., Nguyen H.B. y Le H.T. (1987) Effect of photoperiod on the size of the leydig cell population and the rate of recruitment of leydig cells in adult syrian hamsters. *Biology of reproduction*, **37**:727–738.
- Johnston H., Baker P.J., Abel M., Charlton H.M., Jackson G., Fleming L., Kumar T.R. y O'Shaughnessy P.J. (2004) Regulation of sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology*, **145**:318–329.
- Ju S.T., Panka D.J., Cui H., Ettinger R., el Khatib M., Sherr D.H., Stanger B.Z. y Marshak-Rothstein A. (1995) Fas(cd95)/fasl interactions required for programmed cell death after t-cell activation. *Nature*, **373**:444–448.
- Kaitu'u-Lino T.J., Sluka P., Foo C.F.H. y Stanton P.G. (2007) *Claudin-11* expression and localisation is regulated by androgens in rat sertoli cells in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, **133**:1169–1179.
- Kaneko K., Akiya Y., Sato H., Tanaka A., Aoki H., Miyoshi M., Abukawa T., Mochizuki M. y Kawakami S. (2005) Seasonal influence on testicular function of male raccoons, *Procyon lotor*. *The Journal of reproduction and development*, **51**:477–482.
- Kaur G., Thompson L.A. y Dufour J.M. (2014) Sertoli cells—immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, **30**:36–44. ISSN 1096-3634.

- Kern S., Robertson S.A., Mau V.J. y Maddocks S. (1995) Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biology of reproduction*, **53**:1407–1416.
- Kerr J.B., Maddocks S. y Sharpe R.M. (1992) Testosterone and fsh have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. *Cell and tissue research*, **268**:179–189.
- Kishimoto A., Ishiguro-Oonuma T., Takahashi R., Maekawa M., Toshimori K., Watanabe M. y Iwanaga T. (2015) Immunohistochemical localization of *GLUT3*, *MCT1*, and *MCT2* in the testes of mice and rats: the use of different energy sources in spermatogenesis. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, **36**:225–234.
- Kobayashi A., Chang H., Chaboissier M.C., Schedl A. y Behringer R.R. (2005) *Sox9* in testis determination. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1061**:9–17.
- Koubova J., Menke D.B., Zhou Q., Capel B., Griswold M.D. y Page D.C. (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**:2474–2479.
- Krentz A.D., Murphy M.W., Kim S., Cook M.S., Capel B., Zhu R., Matin A., Sarver A.L., Parker K.L., Griswold M.D., Looijenga L.H.J., Bardwell V.J. y Zarkower D. (2009) The dm domain protein *dmrt1* is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**:22323–22328.
- Kuwahara S., Mizukami T., Omura M., Hagihara M., Iinuma Y., Shimizu Y., Tamada H., Tsukamoto Y., Nishida T. y Sasaki F. (2000) Seasonal changes in the hypothalamo-pituitary-testes axis of the japanese wood mouse (*Apodemus speciosus*). *The Anatomical record*, **260**:366–372.
- Kyriakis J.M. y Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews*, **81**:807–869.
- Lao-Pérez M., Massoud D., Real F.M., Hurtado A., Ortega E., Burgos M., Jiménez R. y Barrionuevo F.J. (2021) Mediterranean pine vole, *Microtus duodecimcostatus*, a paradigm of an opportunistic breeder. *Animals : an open access journal from MDPI*, **11**.
- LeGrand E.K. (1997) An adaptationist view of apoptosis. *The Quarterly review of biology*, **72**:135–147.
- Li B. y Dewey C.N. (2011) Rsem: accurate transcript quantification from rna-seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, **12**:323.
- Li J.C., Lee T.W., Mruk T.D. y Cheng C.Y. (2001) Regulation of sertoli cell myotubularin (*rmtm*) expression by germ cells in vitro. *Journal of andrology*, **22**:266–277.
- Li J.C., Samy E.T., Grima J., Chung S.S., Mruk D., Lee W.M., Silvestrini B. y Cheng C.Y. (2000) Rat testicular myotubularin, a protein tyrosine phosphatase expressed by sertoli and germ cells, is a potential marker for studying cell-cell interactions in the rat testis. *Journal of cellular physiology*, **185**:366–385.

BIBLIOGRAFÍA

- Li M.W., Mruk D.D. y Cheng C.Y. (2009) Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function. *Trends in Molecular Medicine*, **15**:159–168. ISSN 14714914.
- Li N., Wang T. y Han D. (2012) Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Frontiers in immunology*, **3**:152. ISSN 1664-3224.
- Li Z.G., Danis V.A. y Brooks P.M. (1993) Effect of gonadal steroids on the production of il-1 and il-6 by blood mononuclear cells in vitro. *Clinical and experimental rheumatology*, **11**:157–162. ISSN 0392-856X.
- Liao Y., Smyth G.K. y Shi W. (2019) The r package rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of rna sequencing reads. *Nucleic acids research*, **47**:e47. ISSN 1362-4962.
- Lie P.P., Cheng C.Y. y Mruk D.D. (2013) Signalling pathways regulating the blood–testis barrier. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **45**:621–625.
- Lie P.P.Y., Mruk D.D., Lee W.M. y Cheng C.Y. (2010) Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **365**:1581–1592.
- Lindsey J.S. y Wilkinson M.F. (1996) Pem: a testosterone- and lh-regulated homeobox gene expressed in mouse sertoli cells and epididymis. *Developmental biology*, **179**:471–484.
- Lockshin R.A. y Zakeri Z. (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **36**:2405–2419.
- López C., Aguilar R., Nardocci G., Cereceda K., Vander Stelt K., Slebe J.C., Montecino M. y Concha I.I. (2019) Wnt beta-catenin signaling enhances transcription of the *CX43* gene in murine sertoli cells. *Journal of cellular biochemistry*, **120**:6753–6762.
- Luaces J.P., Rossi L.F., Merico V., Zuccotti M., Redi C.A., Solari A.J., Merani M.S. y Garagna S. (2013) Spermatogenesis is seasonal in the large hairy armadillo, *Chaetophractus villosus* (dasyproctidae, xenarthra, mammalia). *Reproduction, fertility, and development*, **25**:547–557.
- Luaces J.P., Rossi L.F., Sciurano R.B., Rebuzzini P., Merico V., Zuccotti M., Merani M.S. y Garagna S. (2014) Loss of sertoli-germ cell adhesion determines the rapid germ cell elimination during the seasonal regression of the seminiferous epithelium of the large hairy armadillo *Chaetophractus villosus*. *Biology of reproduction*, **90**:48.
- Lui W.y., Lee W.M. y Cheng C.Y. (2003) Sertoli-Germ Cell Adherens Junction Dynamics in the Testis Are Regulated by *RhoB* GTPase via the ROCK/LIMK Signaling Pathway1. *Biology of Reproduction*, **68**:2189–2206. ISSN 0006-3363.
- da Luz Mathias M. (1990) Morphology of the incisors and the burrowing activity of mediterranean and lusitanian pine voles (mammalia, rodentia). *Mammalia*.
- Lyng F.M., Jones G.R. y Rommerts F.F. (2000) Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and

- two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biology of reproduction*, **63**:736–747. ISSN 0006-3363.
- M Happold D.H. (2013) Mammals of africa. *Bloomsbury Natural*.
- M Real F., Haas S.A., Franchini P., Xiong P., Simakov O., Kuhl H., Schöpflin R., Heller D., Moeinzadeh M.H., Heinrich V., Krannich T., Bressin A., Hartmann M.F., Wudy S.A., Dechmann D.K.N., Hurtado A., Barrionuevo F.J., Schindler M., Harabula I., Osterwalder M., Hiller M., Wittler L., Visel A., Timmermann B., Meyer A., Vingron M., Jiménez R., Mundlos S. y Lupiáñez D.G. (2020) The mole genome reveals regulatory rearrangements associated with adaptive intersexuality. *Science (New York, N.Y.)*, **370**:208–214. ISSN 1095-9203.
- MacManes M.D. (2018) The oyster river protocol: a multi-assembler and kmer approach for de novo transcriptome assembly. *PeerJ*, **6**:e5428.
- Maddocks S. y Setchell B.P. (1990) Recent evidence for immune privilege in the testis. *Journal of reproductive immunology*, **18**:9–18.
- Maekawa M., Kamimura K. y Nagano T. (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology*, **59**:1–13.
- Martin G.B., Tjondronegoro S. y Blackberry M.A. (1994) Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. *Journal of reproduction and fertility*, **101**:121–128.
- Martín-Blanco E. (2000) p38 mapk signalling cascades: ancient roles and new functions. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **22**:637–645.
- Massoud D., Barrionuevo F.J., Ortega E., Burgos M. y 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.
- Massoud D., Lao-Pérez M., Hurtado A., Abdo W., Palomino-Morales R., Carmona F.D., Burgos M., Jiménez R. y Barrionuevo F.J. (2018) Germ cell desquamation-based testis regression in a seasonal breeder, the egyptian long-eared hedgehog, *Hemiechinus auritus*. *PLoS one*, **13**:e0204851.
- Massoud D., Lao-Pérez M., Ortega E., Burgos M., Jiménez R. y Barrionuevo F.J. (2021) Divergent seasonal reproductive patterns in syntopic populations of two murine species in southern spain. *Animals : an open access journal from MDPI*, **11**.
- Matson C.K., Murphy M.W., Sarver A.L., Griswold M.D., Bardwell V.J. y Zarkower D. (2011) *DMRT1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, **476**:101–104.
- McClusky L.M. (2012) Coordination of spermatogenic processes in the testis: lessons from cystic spermatogenesis. *Cell and tissue research*, **349**:703–715.
- Meinhardt A., Bacher M., Metz C., Bucala R., Wreford N., Lan H., Atkins R. y Hedger M. (1998) Local regulation of macrophage subsets in the

BIBLIOGRAFÍA

- adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biology of reproduction*, **59**:371–378.
- Mellon S.H. y Deschepper C.F. (1993) Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain research*, **629**:283–292.
- Meng J., Holdcraft R.W., Shima J.E., Griswold M.D. y 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.
- Meng J., Mostaghel E.A., Vakar-Lopez F., Montgomery B., True L. y Nelson P.S. (2011) Testosterone regulates tight junction proteins and influences prostatic autoimmune responses. *Hormones & cancer*, **2**:145–156.
- Miller W.L. (1988) Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine reviews*, **9**:295–318.
- Miriam Schoenfeld Y.Y.T. (2009) The biology of two species of hedgehogs, *Erinaceus europaeus concolor* and *Hemiechinus auritus aegyptius*, in israel. *Mammalia - International Journal of the Systematics, Biology and Ecology of Mammals*.
- Mital P., Hinton B.T. y Dufour J.M. (2011) The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of reproduction*, **84**:851–858.
- ML M. (1984) A biologia de *Microtus (Pitymys) duodecimcostatus* de selys-longchamps, 1839 e m. (p.) lusitanicus gerbe, 1879 em portugal (arvicolidae, rodentia) : taxonomia, osteologia, ecologia e adaptacoes. *Lisbon University's Online Catalog*.
- Moldovan G.L., Pfander B. y Jentsch S. (2006) Pcna controls establishment of sister chromatid cohesion during s phase. *Molecular cell*, **23**:723–732.
- Morales C. y Griswold M.D. (1987) Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology*, **121**:432–434.
- Morales E., Ferrer C., Zuasti A., Garcia-Borron J.C., Canteras M. y Pastor L.M. (2007) Apoptosis and molecular pathways in the seminiferous epithelium of aged and photoinhibited syrian hamsters *Mesocricetus auratus*. *Journal of andrology*, **28**:123–135. ISSN 0196-3635.
- Morales E., Pastor L.M., Ferrer C., Zuasti A., Pallarés J., Horn R., Calvo A., Santamaría L. y Canteras M. (2002) Proliferation and apoptosis in the seminiferous epithelium of photoinhibited syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *International journal of andrology*, **25**:281–287.
- Mruk D.D. y Cheng C.Y. (2004) Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine reviews*, **25**:747–806.
- Muñoz E., Fogal T., Dominguez S., Scardapane L., Guzmán J. y Piezzi R.S. (1997) Seasonal changes of the leydig cells of viscacha (*Lagostomus maximus*

- maximus*). a light and electron microscopy study. *Tissue & cell*, **29**:119–128.
- Nakai M., Chen L. y Nowak R.A. (2006) Tissue distribution of basigin and monocarboxylate transporter 1 in the adult male mouse: a study using the wild-type and basigin gene knockout mice. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, **288**:527–535.
- Nakane Y. y Yoshimura T. (2019) Photoperiodic regulation of reproduction in vertebrates. *Annual review of animal biosciences*, **7**:173–194.
- Neaves W.B. (1973) Changes in testicular leydig cells and in plasma testosterone levels among seasonally breeding rock hyrax. *Biology of reproduction*, **8**:451–466.
- Neaves W.B. (1978) The pattern of gonadotropin-induced change in plasma testosterone, testicular esterified cholesterol and leydig cell lipid droplets in immature mice. *Biology of reproduction*, **19**:864–871.
- Nebert D.W., Nelson D.R., Coon M.J., Estabrook R.W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C. y Johnson E.F. (1991) The p450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and cell biology*, **10**:1–14.
- Nelson R.J., Demas G.E., Klein S.L. y Kriegsfeld L.J. (1995) The influence of season, photoperiod, and pineal melatonin on immune function. *Journal of pineal research*, **19**:149–165.
- Ni F.D., Hao S.L. y Yang W.X. (2019) Multiple signaling pathways in sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. *Cell death & disease*, **10**:541.
- Nicholls P.K., Harrison C.A., Rainczuk K.E., Wayne Vogl A. y Stanton P.G. (2013) Retinoic acid promotes sertoli cell differentiation and antagonises activin-induced proliferation. *Molecular and cellular endocrinology*, **377**:33–43.
- Nicholls P.K., Stanton P.G., Chen J.L., Olcorn J.S., Haverfield J.T., Qian H., Walton K.L., Gregorevic P. y Harrison C.A. (2012) Activin signaling regulates sertoli cell differentiation and function. *Endocrinology*, **153**:6065–6077.
- Nigam S.K., Rodriguez-Boulan E. y Silver R.B. (1992) Changes in intracellular calcium during the development of epithelial polarity and junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**:6162–6166.
- O'Donnell L. y O'Bryan M.K. (2014) Microtubules and spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, **30**:45–54.
- Ohta Y., Nishikawa A., Fukazawa Y., Urushitani H., Matsuzawa A., Nishina Y. y Iguchi T. (1996) Apoptosis in adult mouse testis induced by experimental cryptorchidism. *Acta anatomica*, **157**:195–204.
- Olaso R., Pairault C., Boulogne B., Durand P. y Habert R. (1998) Transforming growth factor *beta1* and *beta2* reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. *Endocrinology*, **139**:733–740.
- el Omari B., Lacroix A. y Saboureau M. (1989) Daily and seasonal variations in

BIBLIOGRAFÍA

- plasma lh and testosterone concentrations in the adult male hedgehog (*Eri-naceus europaeus*). *Journal of reproduction and fertility*, **86**:145–155.
- Palombi F., Farini D., Salanova M., de Grossi S. y Stefanini M. (1992) Development and cytodifferentiation of peritubular myoid cells in the rat testis. *The Anatomical record*, **233**:32–40.
- Pastor L.M., Zuasti A., Ferrer C., Bernal-Mañas C.M., Morales E., Beltrán-Frutos E. y Seco-Rovira V. (2011) Proliferation and apoptosis in aged and photoregressed mammalian seminiferous epithelium, with particular attention to rodents and humans. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, **46**:155–164.
- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K. y Cobb M.H. (2001) Mitogen-activated protein (map) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*, **22**:153–183.
- Pelletier R.M. (1986) Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*), a seasonal breeder. *The American journal of anatomy*, **175**:91–117.
- Pelletier R.M. (1988) Cyclic modulation of sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *The American journal of anatomy*, **183**:68–102.
- Pelletier R.M. (2011) The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, **46**:49–127.
- Pelletier R.M. y Byers S.W. (1992) The blood-testis barrier and sertoli cell junctions: structural considerations. *Microscopy research and technique*, **20**:3–33.
- Petricca S., Flati V., Celenza G., Di Gregorio J., Lizzi A.R., Luzi C., Cristiano L., Cinque B., Rossi G., Festuccia C. y Iorio R. (2019) Tebuconazole and econazole act synergistically in mediating mitochondrial stress, energy imbalance, and sequential activation of autophagy and apoptosis in mouse sertoli tm4 cells: Possible role of ampk/ulk1 axis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **169**:209–223.
- Petter-Rousseaux A. y Picon R. (1981) Annual variation in the plasma testosterone in *Microcebus murinus*. *Folia primatologica; international journal of primatology*, **36**:183–190.
- Pitrosky B. y Pévet P. (1997) The photoperiodic response in syrian hamsters depends upon a melatonin-driven rhythm of sensitivity to melatonin. *Biological signals*, **6**:264–271.
- Pittman D.L., Cobb J., Schimenti K.J., Wilson L.A., Cooper D.M., Brignull E., Handel M.A. y Schimenti J.C. (1998) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmc1*, a germline-specific recombination-specific protein. *Molecular cell*, **1**:697–705.
- Plant T.M., Ramaswamy S. y Dipietro M.J. (2006) Repetitive activation of hypothalamic g protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology*, **147**:1007–1013.

- Prakash I. (1960) Breeding of mammals in rajasthan desert, india. *Journal of Mammalogy*, Vol. 41, No. 3.
- Pévet P. (1988) The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reproduction, nutrition, developpement*, **28**:443–458.
- Raburn D.J., Coquelin A., Reinhart A.J. y Hutson J.C. (1993) Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis. *Journal of reproductive immunology*, **24**:139–151.
- Raff M. (1998) Cell suicide for beginners. *Nature*, **396**:119–122.
- Rao M.K., Pham J., Imam J.S., MacLean J.A., Murali D., Furuta Y., Sinha-Hikim A.P. y Wilkinson M.F. (2006) Tissue-specific rnai reveals that *WT1* expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes & development*, **20**:147–152. ISSN 0890-9369.
- Rato L., Alves M.G., Socorro S., Carvalho R.A., Cavaco J.E. y Oliveira P.F. (2012) Metabolic modulation induced by oestradiol and dht in immature rat sertoli cells cultured in vitro. *Bioscience reports*, **32**:61–69.
- Raymond C.S., Murphy M.W., O’Sullivan M.G., Bardwell V.J. y Zarkower D. (2000) *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes & development*, **14**:2587–2595.
- Reddy K.B., Nabha S.M. y Atanaskova N. (2003) Role of map kinase in tumor progression and invasion. *Cancer metastasis reviews*, **22**:395–403.
- Revel F.G., Ansel L., Klosen P., Saboureau M., Pévet P., Mikkelsen J.D. y Simonneaux V. (2007) Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, **8**:57–65.
- Reyes J.G., Herrera E., Lobos L., Salas K., Lagos N., Jorquera R.A., Labarca P. y Benos D.J. (2002) Dynamics of intracellular calcium induced by lactate and glucose in rat pachytene spermatocytes and round spermatids. *Reproduction (Cambridge, England)*, **123**:701–710.
- Richardson L.L., Kleinman H.K. y Dym M. (1995) Basement membrane gene expression by sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biology of reproduction*, **52**:320–330.
- Robinson M.D., McCarthy D.J. y 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.
- Russell L.D. y Clermont Y. (1977) Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *The Anatomical record*, **187**:347–366.
- Russell L.D., Malone J.P. y MacCurdy D.S. (1981) Effect of the microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine, on seminiferous tubule structure in the rat. *Tissue & cell*, **13**:349–367.
- Russell L.D. y Peterson R.N. (1985) Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *International review of cytology*, **94**:177–211.

BIBLIOGRAFÍA

- Sakai K., Ito C., Wakabayashi M., Kanzaki S., Ito T., Takada S., Toshimori K., Sekita Y. y Kimura T. (2019) *Usp26* mutation in mice leads to defective spermatogenesis depending on genetic background. *Sci Rep*, **9**:13757. ISSN 2045-2322.
- Santos S.M., Mira A.P. y L. M.M. (2009) Factors influencing large-scale distribution of two sister species of pine voles (*Microtus lusitanicus* and *Microtus duodecimcostatus*): the importance of spatial autocorrelation. *Canadian Journal of Zoology*.
- Sar M., Lubahn D.B., French F.S. y Wilson E.M. (1990) Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*, **127**:3180–3186.
- Sarkar O., Mathur P.P., Cheng C.Y. y Mruk D.D. (2008) Interleukin 1 alpha (*IL1A*) is a novel regulator of the blood-testis barrier in the rat. *Biology of reproduction*, **78**:445–454.
- Sasso-Cerri E., Cerri P.S., Freymüller E. y Miraglia S.M. (2006) Apoptosis during the seasonal spermatogenic cycle of *Rana catesbeiana*. *Journal of anatomy*, **209**:21–29.
- Sato T., Tachiwana T., Takata K., Tay T.W., Ishii M., Nakamura R., Kimura S., Kanai Y., Kurohmaru M. y Hayashi Y. (2005) Testicular dynamics in syrian hamsters exposed to both short photoperiod and low ambient temperature. *Anatomia, histologia, embryologia*, **34**:220–224.
- Schell C., Albrecht M., Mayer C., Schwarzer J.U., Frungieri M.B. y Mayerhofer A. (2008) Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*, **149**:1678–1686.
- Schön J., Göritz F., Streich J. y Blottner S. (2004) Histological organization of roe deer testis throughout the seasonal cycle: variable and constant components of tubular and interstitial compartment. *Anatomy and embryology*, **208**:151–159.
- Schoenfeld M. y Yom-Tov Y. (1985) The biology of two species of hedgehogs, *Erinaceus europaeus concolor* and *Hemiechinus auritus aegyptius*, in israel. *Mammalia*, t. 49, n° 3.
- Schuppe H.C. y Meinhardt A. (2005) Immune privilege and inflammation of the testis. *Chemical immunology and allergy*, **88**:1–14.
- Schwartz W.J., de la Iglesia H.O., Zlomanczuk P. y Illnerová H. (2001) Encoding le quattro stagioni within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *Journal of biological rhythms*, **16**:302–311.
- Seco-Rovira V., Beltrán-Frutos E., Ferrer C., Saez F.J., Madrid J.F., Canteras M. y Pastor L.M. (2015) Testicular histomorphometry and the proliferative and apoptotic activities of the seminiferous epithelium in syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) during regression owing to short photoperiod. *Andrology*, **3**:598–610.
- Seco-Rovira V., Beltrán-Frutos E., Ferrer C., Sáez F.J., Madrid J.F. y Pastor L.M. (2014) The death of sertoli cells and the capacity to phagocytize elongated spermatids during testicular regression due

- to short photoperiod in syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Biology of reproduction*, **90**:107.
- Sekido R. y Lovell-Badge R. (2008) Sex determination involves synergistic action of *SRY* and *SF1* on a specific *Sox9* enhancer. *Nature*, **453**:930–934.
- Seppely M., Manni M. y Zdobnov E.M. (2019) Busco: Assessing genome assembly and annotation completeness. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **1962**:227–245.
- Setchell B.P., Uksila J., Maddocks S. y Pöllänen P. (1990) Testis physiology relevant to immunoregulation. *Journal of reproductive immunology*, **18**:19–32.
- Shang Y., Myers M. y Brown M. (2002) Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular cell*, **9**:601–610.
- Sharp P.A., Sugden B. y 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., Donachie K. y Cooper I. (1988) Re-evaluation of the intratesticular level of testosterone required for quantitative maintenance of spermatogenesis in the rat. *The Journal of endocrinology*, **117**:19–26.
- Shenbrot G.I., Krasnov B.R. *et al.* (2005) *Atlas of the geographic distribution of the arvicoline rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae)*. Pensoft.
- Sheng X., Zhang H., Zhang W., Song M., Zhang M., Li B., Weng Q., Watanabe G. y Taya K. (2008) Seasonal changes in spermatogenesis and immunolocalization of inhibin/activin subunits in the wild male ground squirrel (*Citellus dardicus Brandt*). *The Journal of reproduction and development*, **54**:460–464.
- Shukla K.K., Mahdi A.A. y Rajender S. (2012) Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, **4**:746–754.
- Simonneaux V. y Ribelayga C. (2003) Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological reviews*, **55**:325–395.
- 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. y 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.
- Sinha Hikim A.P., Bartke A. y Russell L.D. (1988) Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biology of reproduction*, **39**:1225–1237.
- Siu M.K.Y., Wong C.H., Lee W.M. y Cheng C.Y. (2005) Sertoli-germ cell anchoring junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of lipid and protein kinases. *The Journal of biological chemistry*, **280**:25029–25047.
- Skinner M.K., Tung P.S. y Fritz I.B. (1985) Cooperativity between sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular

BIBLIOGRAFÍA

- matrix components. *The Journal of cell biology*, **100**:1941–1947.
- SM Giannoni CE Borghi J.M.R. (1993) Comparing the burrowing behaviour of the iberian mole voles (*Microtus (Terricola) lusitanicus*, *M.(T.) pyrenaicus* and *M.(T.) duodecimcostatus*). *Mammalia - International Journal of the Systematics, Biology and Ecology of Mammals*.
- Spaliviero J.A., Jimenez M., Allan C.M. y Handelsman D.J. (2004) Luteinizing hormone receptor-mediated effects on initiation of spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice are replicated by testosterone. *Biology of reproduction*, **70**:32–38.
- Spät A., Pitter J.G., Rohács T. y Szabadkai G. (2001) Stimulus-secretion coupling and mitochondrial metabolism in steroid-secreting cells. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, **16**:197–200.
- Stanton P.G. (2016) Regulation of the blood-testis barrier. *Seminars in cell & developmental biology*, **59**:166–173.
- Strbenc M., Fazarinc G., Bavdek S.V. y Pogacnik A. (2003) Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the brown hare (*Lepus europaeus L.*). *Anatomia, histologia, embryologia*, **32**:48–53.
- Stuart R.O., Sun A., Bush K.T. y Nigam S.K. (1996) Dependence of epithelial intercellular junction biogenesis on thapsigargin-sensitive intracellular calcium stores. *The Journal of biological chemistry*, **271**:13636–13641.
- Stuart R.O., Sun A., Panichas M., Hebert S.C., Brenner B.M. y Nigam S.K. (1994) Critical role for intracellular calcium in tight junction biogenesis. *Journal of cellular physiology*, **159**:423–433.
- Stupack D.G., Cho S.Y. y Klemke R.L. (2000) Molecular signaling mechanisms of cell migration and invasion. *Immunol Res*, **21**:83–88. ISSN 1559-0755.
- Sugimoto R., Nabeshima Y.i. y Yoshida S. (2012) Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mechanisms of development*, **128**:610–624.
- Sun Q.Y., Breitbart H. y Schatten H. (1999) Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, **11**:443–450. ISSN 1448-5990.
- Sun Y., Liu W.Z., Liu T., Feng X., Yang N. y Zhou H.F. (2015) Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, **35**:600–604. ISSN 1079-9893.
- Sun Y., Yu H., Zheng D., Cao Q., Wang Y., Harris D. y Wang Y. (2011) Sudan black B reduces autofluorescence in murine renal tissue. *Archives of pathology & laboratory medicine*, **135**:1335–1342.
- Superina M. y Jahn G.A. (2009) Seasonal reproduction in male pichis *Zaedyus pichiy* (xenarthra: Dasypodidae) estimated by fecal androgen metabolites and testicular histology. *Animal reproduction science*, **112**:283–292.
- Suzuki F. y Racey P.A. (1978) The organization of testicular interstitial tissue

- and changes in the fine structure of the leydig cells of european moles (*Talpa europaea*) throughout the year. *Journal of reproduction and fertility*, **52**:189–194.
- Tamarkin L., Hutchison J.S. y Goldman B.D. (1976) Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the syrian hamster. *Endocrinology*, **99**:1528–1533.
- Tang E.I., Mruk D.D. y Cheng C.Y. (2013) Map/microtubule affinity-regulating kinases, microtubule dynamics, and spermatogenesis. *The Journal of endocrinology*, **217**:R13–R23.
- Tang E.I., Mruk D.D. y Cheng C.Y. (2016) Regulation of microtubule (mt)-based cytoskeleton in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, **59**:35–45.
- Tartarin P., Guibert E., Touré A., Ouiste C., Leclerc J., Sanz N., Brière S., Dacheux J.L., Delaleu B., McNeilly J.R., McNeilly A.S., Brillard J.P., Dupont J., Foretz M., Viollet B. y Froment P. (2012) Inactivation of ampk $\alpha 1$ induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology*, **153**:3468–3481.
- Tarulli G.A., Meachem S.J., Schlatt S. y Stanton P.G. (2008) Regulation of testicular tight junctions by gonadotrophins in the adult djungarian hamster in vivo. *Reproduction (Cambridge, England)*, **135**:867–877.
- Temple J.L. (2004) The musk shrew (*Suncus murinus*): a model species for studies of nutritional regulation of reproduction. *ILAR journal*, **45**:25–34.
- Temple J.L., Millar R.P. y Rissman E.F. (2003) An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. *Endocrinology*, **144**:13–19.
- Tähkä K.M., Teräväinen T., Pankakoski E. y Jalkanen M. (1989) The testes of moles (*Talpa europaea*) retain a considerable microsomal capacity for androgen synthesis during seasonal regression. *General and comparative endocrinology*, **76**:301–309.
- Thompson E.B. (1994) Apoptosis and steroid hormones. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, **8**:665–673.
- Trigunaite A., Dimo J. y Jørgensen T.N. (2015) Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cellular Immunology*, **294**:87–94. ISSN 0008-8749.
- Tripathi R., Mishra D.P. y Shaha C. (2009) Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *Journal of reproductive immunology*, **83**:31–35.
- Tsai M.Y., Yeh S.D., Wang R.S., Yeh S., Zhang C., Lin H.Y., Tzeng C.R. y Chang C. (2006) Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**:18975–18980.
- Tsubota T., Howell-Skalla L., Nitta H., Osawa Y., Mason J.I., Meiers P.G., Nelson R.A. y Bahr J.M. (1997) Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *Journal of reproduction and fertility*, **109**:21–27.
- Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E.M.

BIBLIOGRAFÍA

- y Lipsky P.E. (2006) Tnf downmodulates the function of human cd4+cd25hi t-regulatory cells. *Blood*, **108**:253–261. ISSN 0006-4971.
- Vaux D.L. y Strasser A. (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**:2239–2244.
- Vidal V.P., Chaboissier M.C., de Rooij D.G. y Schedl A. (2001) *Sox9* induces testis development in xx transgenic mice. *Nature genetics*, **28**:216–217.
- Vitale R., Fawcett D.W. y Dym M. (1973) The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clophene and estrogen treatment. *The Anatomical record*, **176**:331–344.
- viviD D. y Bentley G.E. (2018) Seasonal reproduction in vertebrates: Melatonin synthesis, binding, and functionality using tinbergen’s four questions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **23**.
- Walker W.H. y Cheng J. (2005) Fsh and testosterone signaling in sertoli cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, **130**:15–28.
- Wang J., Wreford N.G., Lan H.Y., Atkins R. y Hedger M.P. (1994) Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biology of reproduction*, **51**:551–561.
- Wang X., Adegoke E.O., Ma M., Huang F., Zhang H., Adeniran S.O., Zheng P. y Zhang G. (2019) Influence of Wilms’ tumor suppressor gene *WT1* on bovine Sertoli cells polarity and tight junctions via non-canonical WNT signaling pathway. *Theriogenology*, **138**:84–93. ISSN 0093-691X.
- Wang Y., Zhang J., Yi X.j. y Yu F.S.X. (2004) Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research*, **78**:125–136. ISSN 0014-4835.
- Wen Q., Tang E.I., Xiao X., Gao Y., Chu D.S., Mruk D.D., Silvestrini B. y Cheng C.Y. (2016) Transport of germ cells across the seminiferous epithelium during spermatogenesis—the involvement of both actin- and microtubule-based cytoskeletons. *Tissue barriers*, **4**:e1265042.
- Wheeler K., Tardif S., Rival C., Luu B., Bui E., Del Rio R., Teuscher C., Sparwasser T., Hardy D. y Tung K.S.K. (2011) Regulatory t cells control tolerogenic versus autoimmune response to sperm in vasectomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**:7511–7516. ISSN 1091-6490.
- Willems A., Batlouni S.R., Esnal A., Swinnen J.V., Saunders P.T.K., Sharpe R.M., França L.R., De Gendt K. y Verhoeven G. (2010) Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PloS one*, **5**:e14168.
- Winnall W.R., Ali U., O’Bryan M.K., Hirst J.J., Whiley P.A.F., Muir J.A. y Hedger M.P. (2007) Constitutive expression of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 by somatic and spermatogenic cells is responsible for prostaglan-

- din e2 production in the adult rat testis. *Biology of reproduction*, **76**:759–768.
- Wong C.H. y Cheng C.Y. (2005) The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Current topics in developmental biology*, **71**:263–296.
- Wong C.h., Mruk D.D., Lui W.y y Cheng C.Y. (2004) Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. *Journal of Cell Science*, **117**:783–798. ISSN 0021-9533.
- Wosnitzer M.S., Mielnik A., Dabaja A., Robinson B., Schlegel P.N. y Paduch D.A. (2014) Ubiquitin Specific Protease 26 (USP26) Expression Analysis in Human Testicular and Extragonadal Tissues Indicates Diverse Action of USP26 in Cell Differentiation and Tumorigenesis. *PLOS ONE*, **9**:e98638. ISSN 1932-6203.
- Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. y Massagué J. (1994) Mechanism of activation of the tgf-beta receptor. *Nature*, **370**:341–347.
- Wright S. (1932) The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding, and selection in evolution. *Proceedings of the Sixth International Congress on Genetics: Ithaca, New York*.
- Wunderlich F., Benten W.P.M., Lieberherr M., Guo Z., Stamm O., Wrehlke C., Sekeris C.E. y Mossmann H. (2002) Testosterone signaling in t cells and macrophages. *Steroids*, **67**:535–538.
- Wyllie A.H., Kerr J.F. y Currie A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*, **68**:251–306.
- Xia W., Mruk D.D., Lee W.M. y Cheng C.Y. (2006) Differential Interactions between Transforming Growth Factor- β 3/T β R1, TAB1, and CD2AP Disrupt Blood-Testis Barrier and Sertoli-Germ Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.*, **281**:16799–16813. ISSN 0021-9258, 1083-351X.
- Xia W., Wong C.H., Lee N.P.Y., Lee W.M. y Cheng C.Y. (2005) Disruption of sertoli-germ cell adhesion function in the seminiferous epithelium of the rat testis can be limited to adherens junctions without affecting the blood-testis barrier integrity: an in vivo study using an androgen suppression model. *Journal of cellular physiology*, **205**:141–157.
- Xia W., Wong E.W.P., Mruk D.D. y Cheng C.Y. (2009) Tgf-beta3 and tnfalpa perturb blood-testis barrier (btb) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of btb regulation during spermatogenesis. *Developmental biology*, **327**:48–61.
- Yan H.H.N., Mruk D.D., Lee W.M. y Cheng C.Y. (2008) Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in sertoli cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **22**:1945–1959. ISSN 1530-6860.
- Yazawa T., Yamamoto T. y Abé S. (2000) Prolactin induces apoptosis in the penultimate spermatogonial stage of the testes in japanese red-bellied newt (*Cynops pyrrhogaster*). *Endocrinology*, **141**:2027–2032. ISSN 0013-7227.

BIBLIOGRAFÍA

- Yeh S., Tsai M.Y., Xu Q., Mu X.M., Lardy H., Huang K.E., Lin H., Yeh S.D., Altuwaijri S., Zhou X., Xing L., Boyce B.F., Hung M.C., Zhang S., Gan L., Chang C. y Hung M.C. (2002) Generation and characterization of androgen receptor knockout (arko) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**:13498–13503.
- Yoshida K., Kondoh G., Matsuda Y., Habu T., Nishimune Y. y Morita T. (1998) The mouse reca-like gene *Dmcl* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Molecular cell*, **1**:707–718.
- Young K.A., Ball G.F. y Nelson R.J. (2001) Photoperiod-induced testicular apoptosis in european starlings *Sturnus vulgaris*. *Biology of reproduction*, **64**:706–713.
- Young K.A. y Nelson R.J. (2001) Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction (Cambridge, England)*, **122**:677–685.
- Young K.A., Zirkin B.R. y Nelson R.J. (1999) Short photoperiods evoke testicular apoptosis in white-footed mice *Peromyscus leucopus*. *Endocrinology*, **140**:3133–3139.
- Yu G., Wang L.G., Han Y. y He Q.Y. (2012) clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, **16**:284–287.
- Zayed A.E., Hifny A., Abou-Elmagd A. y Wrobel K.H. (1995) Seasonal changes in the intertubular tissue of the camel testis (*Camelus dromedarius*). *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, **177**:199–212.
- Zhang F.P., Pakarainen T., Poutanen M., Toppari J. y Huhtaniemi I. (2003) The low gonadotropin-independent constitutive production of testicular testosterone is sufficient to maintain spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**:13692–13697.
- Zhang H., Yin Y., Wang G., Liu Z., Liu L. y Sun F. (2014) Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated erk in sertoli cells. *Scientific reports*, **4**:1–7.
- Zhang L., Han X.K., Qi Y.Y., Liu Y. y Chen Q.S. (2008) Seasonal effects on apoptosis and proliferation of germ cells in the testes of the Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Theriogenology*, **69**:1148–1158. ISSN 0093-691X.
- Zhao S., Zhu W., Xue S. y Han D. (2014) Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cellular & molecular immunology*, **11**:428–437. ISSN 2042-0226.