



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**HISTOLOGÍA, ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y
APOPTÓTICA DURANTE LA REGRESIÓN TESTICULAR
PRODUCIDA POR FOTOPERIODO CORTO EN EL
EPITELIO SEMINÍFERO DEL HÁMSTER SIRIO
(*Mesocricetus auratus*).**

**HISTOLOGY, PROLIFERATIVE AND APOPTOTIC ACTI
VITY DURING TESTICULAR REGRESSION DUE
TO SHORT PHOTOPERIOD IN THE SEMINIFEROUS
EPITHELIUM OF SYRIAN HAMSTER (*Mesocricetus
auratus*)**

Vicente Seco Rovira

2015

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Lectin histochemistry as a tool to identify apoptotic cells in the seminiferous epithelium of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) subjected to short photoperiod. Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Ferrer C, Sánchez-Huertas M M, Madrid J F, Saez F J & Pastor L M. (2013) *Reprod Domest Anim* **48**, 974-983.

The death of Sertoli cells and the capacity to phagocytize elongated spermatids during testicular regression due to short photoperiod in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Ferrer C, Sáez F J, Madrid J F & Pastor L M. (2014) *Biol Reprod* **90**, 107.

Testicular histomorphometry and the proliferative and apoptotic activities of the seminiferous epithelium in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) during regression owing to short photoperiod. Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Ferrer C, FJ Saez, Madrid JF, Canteras M, Pastor LM. (2015) *Andrology* **3**(3):598-610. doi: 10.1111/andr.12037.



Luis Miguel Pastor García Catedrático de Biología Celular y Concepción Ferrer Cazorla Profesora Titular de Biología Celular ambos del Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina de Murcia y directores de la tesis doctoral titulada: Histología, actividad proliferativa y apoptotica durante la regresión testicular producida por fotoperiodo corto en el epitelio seminífero del hámster sirio (*Mesocricetus auratus*).

Consideran:

Que es muy oportuna la presentación por parte del alumno de doctorado Vicente Seco Rovira de esta tesis doctoral en forma de compendio de publicaciones en cuanto que los resultados que se presentan en dichos trabajos tienen una unidad de contenidos y son complementarios entre sí. Además, esta forma de presentación se justifica por la metodología de trabajo que se eligió desde el principio para la realización de dicha tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos a 22 de Abril de 2015

Luis M. Pastor

Concepción Ferrer



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Luis Miguel Pastor García , Catedrático de Universidad del Área de Biología Celular en el Departamento de Biología Celular e Histología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "HISTOLOGÍA, ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y APOPTÓTICA DURANTE LA REGRESIÓN TESTICULAR PRODUCIDA POR FOTOPERIODO CORTO EN EL EPITELIO SEMINÍFERO DEL HÁMSTER SIRIO (*Mesocricetus auratus*).", realizada por D. Vicente Seco Rovira, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de Mayo de 2015

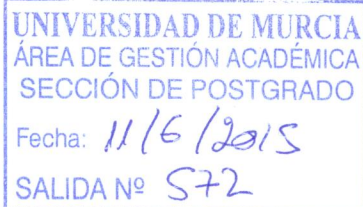
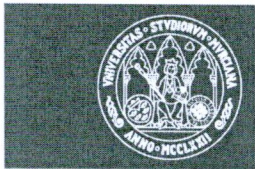
Luis M. Pastor



D^a. Concepción Ferrer Cazorla , Profesora Titular de Universidad del Área de Biología Celular en el Departamento de Biología Celular e Histología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "HISTOLOGÍA, ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y APOPTÓTICA DURANTE LA REGRESIÓN TESTICULAR PRODUCIDA POR FOTOPERIODO CORTO EN EL EPITELIO SEMINÍFERO DEL HÁMSTER SIRIO (*Mesocricetus auratus*).", realizada por D. Vicente Seco Rovira, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de Mayo de 2015



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Planificación de Enseñanzas

D. VICENTE SECO ROVIRA
C/ Azucena, 13, Urb. Altoreal
30506 Molina de Segura

Vista la solicitud presentada el día 27 de abril de 2015, por D. Vicente Seco Rovira con D.N.I.: 48421696-A, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- el informe previo del Presidente de la Comisión Académica del Doctorado en Integración y Modulación de Señales en Biomedicina , y
- el visto bueno de la Comisión de Ramas de Conocimiento de Ciencias de la Salud ,

resolvió, en su sesión de 10 de junio de de 2015, **ACCEDER** a lo solicitado por el interesado pudiendo, por lo tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones, con los siguientes artículos:

1. Lectin histochemistry as a tool to identify apoptotic cells in the seminiferous epithelium of Syrian hamster (mesocricetus auratus) subjected to short photoperiod.
2. The death of sertoli cell and the capacity to phagocytise elongated spermatids during testicular regression due to short photoperiod in syriam hamster (mesocricetus auratus).
3. Testicular histomorphometry and the proliferative and apoptotic activities of the seminiferous epithelium in syriam hamters (mesocricetus auratus) during regression owing to short photoperiod.

Lo que en cumplimiento del artículo 58 de la vigente Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, de 26 de noviembre, se **notifica a D. VICENTE SECO ROVIRA**, significándole que contra este acuerdo, y conforme a lo establecido en el artículo 21.2 de los Estatutos de la Universidad de Murcia, podrá interponer recurso de alzada ante el Sr. Rector Magfco de esta Universidad, en el plazo de un mes a partir del día siguiente a la recepción de la misma.

Murcia, 10 de junio 2015
Vicerrector de Planificación de Enseñanzas,y
Presidente de la Comisión General de Doctorado

José Manuel Mira Ros

Bari 18th June 2015

The thesis entitled “Histology, proliferative and apoptotic activity during testicular regression due to short photoperiod in the seminiferous epithelium of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*)” presented by the Ph. D. student Vicente Seco Rovira and supervised by the Prof. Luis Miguel Pastor Garcia and Prof. Concepción Ferrer Cazorla makes a significant contribution in the field of the reproduction and specially in the study of testicular regression correlated to photoperiod.

To investigate the aims mentioned in the thesis, the author planifies a series of experiments that are logic and accurately performed. The selection of the methodology used is correct and includes 1) semiquantitative and quantitative study of histomorphometric changes related to proliferation and apoptosis of germ cells, 2) characterization of carbohydrate residues specifically expressed in apoptotic cell types of the seminiferous epithelium, and 3) ultrastructural investigation on the apoptosis of Sertoli cells and their capacity to phagocytize elongated spermatids during testicular regression due to short photoperiod.

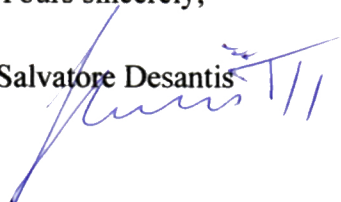
The document is very well organized, the style is clear and shows good orientation of the author in the topic.

The present thesis contained new and original findings which have been published in three papers and that will contribute to a better understanding of the testicular regression due to short photoperiod.

Therefore, I consider of very good quality the thesis presented by Mr. Vicente Seco Rovira and I strongly support it for its defense.

Yours sincerely,

Salvatore Desantis





UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE ANATOMÍA Y BIOLOGÍA DEL DESARROLLO
UNIDAD DE MORFOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA



Santiago de Chile, a jueves 18 de junio de 2015

Carta de idoneidad para
Vicente Seco Rovira

A quien corresponda

El documento escrito de la tesis, como trabajo de investigación original, presentado por el Sr. Vicente Seco Rovira y Titulada “Histología, Actividad Proliferativa y Apoptótica Durante la Regresión Testicular Producida por Fotoperiodo Corto en el Epitelio Seminífero del Hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*), cuenta con todas las cualificaciones técnicas y científicas necesarias y que ameritan su idoneidad para ser presentada por su autor.

Del trabajo de Tesis:

Éste se presenta subdividido en tres partes:

- Presentación en Español
- Presentación en Inglés
- Presentación de Tres artículos científicos resultantes del trabajo realizado en la presente tesis. Las Revistas científicas elegidas *Andrology*, *Reproduction in Domestic Animals*, y *Biology of Reproduction*, todas son de alto prestigio en el área.

1.- El trabajo realizado es muy interesante y extenso. Es abordado con las técnicas adecuadas y analizado correctamente.

2.- Es muy interesante abordar el tema de la regresión fisiológica del testículo (experimental) y luego analizarla con tecnología moderna y consensuada internacionalmente (reproducibilidad). Aunque efectivamente requiere de un extenso trabajo humano.

3.- Todos los objetivos propuestos fueron abordados íntegramente, y los resultados descritos extensamente.

4.- El hecho de haber obtenido ya mínimo tres publicaciones y en tan buenas Revistas Científicas, asegura la importancia de la idea, y la calidad técnica e idoneidad de quien las desarrolló.

En conclusión, luego de haber leído cuidadosamente el trabajo de Tesis presentado por el Sr. Vicente Seco Rovira, es seguro que él amerita con la idoneidad necesaria para desarrollar los pasos siguientes y presentar en defensa su trabajo científico.

Prof. Dr. Héctor Rodríguez
DMV. MSc. DBM-PhD. Diplom (2)
Profesor Asociado

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

STUDENT CERTIFICATE

Name of the host institution:

Department of Animal Science, National Chung Hsing University

IT IS HEREBY CERTIFIED THAT:

Mr./Ms.....**Vicente Seco Rovira**.....

from the University of Murcia has visited our University from 01, October, 2011 to 31, December, 2011

(day month year day month year) in order to attend the following courses/to carry out the following activity.....

Learning techniques for proteomic analysis including **Protein analysis** (preparation of related buffers, use of related equipments, preparation of protein samples, determination of protein concentration, isoelectrofocusing of protein samples, SDS-PAGE of proteins, staining of proteins in gels, scanning of protein gels, quantitation of protein spots on gels by Melanie 7) and **Protein identification by mass assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry** (in-gel digestion of proteins, extraction of peptide mixture and spotting on target, mass spectrometry analysis of peptides, database search for identification)

31, December, 2011

Date

San-Yuan Huang

Stamp and Signature



Name of the signatory: San-Yuan Huang

Function: Associate Professor, Head of Laboratory of Animal Proteomics

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral ha supuesto un largo camino por el que han pasado gran cantidad de personas. Todas ellas me han ayudado en algún momento a mantener la ilusión por terminar este trabajo. Sin ellos en todos los pasos dados en el viaje en el que me embarqué habrían sido mucho más costosos.

A los primeros que quiero dar las gracias son a mis directores de tesis, el Profesor **Luis Miguel Pastor** y la Profesora **Concepción Ferrer** (Concha), por haberme guiado incansablemente en este largo camino. A Luis Miguel por la paciencia y buen hacer que ha demostrado con su becario tranquilo, porque cuando veía que la docencia me sobrepasaba, me animaba a seguir, porque cuando le daba todo lo que iba escribiendo, él pacientemente me corregía con su pluma de color rojo todos los fallos que cometía. Por demostrar una memoria prodigiosa cuando me hablaba de resultados que habíamos obtenido y que yo ni siquiera recordaba o me recordaba la bibliografía que podía necesitar. A Concha por animarme en todo momento a continuar con la tesis cuando me veía agotado por los viajes a Lorca para dar clases. Además, no hay suficiente agradecimiento por todas las veces que me ha dicho que me sustituía en prácticas cuando veía que estaba en momentos críticos con la tesis. Sin todo esto no habría sido posible adquirir todos los conocimientos que tengo ahora.

A la Profesora **Adelina Zuasti**, que siempre me ha hecho sentir que podía con todo en cualquier situación. Ella me convenció de que iba a poder con la docencia en Lorca el primer año cuando, de un día para otro me dijeron que tenía que encargarme de las clases. En mi primer congreso en el que participaba con una comunicación oral, me hizo sentir cómodo y seguro de mí mismo con sus consejos.

A la **Dra. Esther Beltrán**, mi incansable compañera de batallas. Ella me enseñó todo lo necesario para realizar los experimentos de esta tesis; con ella he compartido mil experiencias tanto a nivel docente como investigador; siempre ha estado a mi lado en los momentos duros durante todo este largo camino que ha sido la tesis doctoral. Ella es la que más me ha comprendido en los momentos de agobio porque ella también los ha sufrido. Mil gracias por todo.

A los profesores **José Ballesta, José Ángel Martínez, Manolo Avilés, Juan Francisco Madrid, María Jiménez, María José Izquierdo y Emma Martínez**, mis compañeros del departamento, por hacerme sentir parte importante durante todos estos años en el departamento. Ellos han logrado que mis años aquí estén siendo francamente buenos.

A **Mari Carmen**, por enseñarme todas las técnicas básicas de laboratorio para hacer las prácticas, por procesarme las muestras y hacerme los tampones cuando yo no tenía tiempo y por no haberme dejado sordo con su forma de hablar un tanto elevada. A **Luismi**, por ser un buen amigo y un gran técnico de laboratorio y ayudarme con los semifinos que he utilizado para esta tesis.

Al profesor **Manuel Canteras**, por su inmensa paciencia y buen hacer con mis tablas de datos. Siempre he sido recibido con una inmensa sonrisa por su parte que

producía en mí una gran sensación de afecto y seguridad. Sin su ayuda y conocimientos esta tesis habría sido aún más dura de finalizar.

A todo el servicio técnico de SAI, **María Teresa Castells, Antonio y Fara** del servicio de Analisis de Imagen; **José Joaquín, Manoli, Paco y Maruja** del servicio de microscopía electrónica; **Juana, Toñi y Pepe** del servicio de cultivos celulares. A todos ellos por haberme enseñado y ayudado a realizar partes muy importantes de mi investigación. Sin este apoyo muchos de los resultados de esta tesis no habrían sido posibles.

A todos los “becarios” que han pasado por el departamento durante los años que he estado con la tesis, **Tere, Sara, Wilson y Lili, Airin**. Con todos vosotros he pasado grandísimos momentos aquí, no solo en el plano laboral sino también a nivel personal. Con vosotros me he sentido parte de una gran familia a pesar de estar “en el pasillo”.

Al resto de “becarios”, aunque yo los veo como mis compañeros de fatigas, que están o han estado hasta hace poco tiempo, **Narci, Carla, Blanca, Ascen, Lourdes y Salva**. Con ellos he pasado buenísimos momentos, charlas, intentos de arreglar el mundo. Muchos de ellos ya son doctores, otros lo serán antes o después. No puedo pensar en mejores compañeros de trabajo y amigos como ellos durante estos años.

A los alumnos internos que han pasado por este grupo de investigación, **Salva, Victor y Dani**. Con ellos he pasado muy buenos momentos enseñándoles las técnicas del laboratorio, realizando comunicaciones a congresos y algún que otro artículo. Su compañía ha sido muy gratificante y enriquecedora.

A la nueva incorporación de nuestro grupo de investigación, **Jesús**, mi nuevo compañero de despacho, la persona que ha recogido, en cierto modo, el testigo de mi investigación continuando con ella. Puede que lleves poco tiempo con nosotros pero has dejado una profunda huella en mí (sobre todo por los sándwiches de atún).

Al **San-Yuan Huang** profesor de la Facultad de Ciencias Animales de la National Chung-Hsing University, por aceptarme durante tres meses en su departamento y enseñarme técnicas experimentales que me serán de gran utilidad en el futuro. También tengo que agradecer a todos los becarios, **Shi-Han, Pin-Rong, Cheng-Yu, Yon-Xia** todos los grandísimos momentos que he pasado con ellos, todo lo que me han enseñado, la grandísima acogida que recibí por su parte. Para mí fue una de las mayores experiencias que he vivido en toda mi vida y gran parte de este sentimiento se lo debo a ellos. Cosas como su humor, curioso pero gracioso, sus costumbres, sus forma de pensar, la visión del mundo hicieron que la experiencia vivida sea algo que nunca olvidaré.

A **Celia Pai** y a su marido **Miguel Ángel**, una pareja increíble que me abrió sus brazos en Taichung sin apenas conocerme. Con ellos, los fines de semana se convertían en una fiesta. Además me han mostrado una grandísima valentía a la hora de afrontar

los obstáculos que nos plantea la vida. Espero que sigan formando parte de mi vida por mucho tiempo.

Al Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Biología, en especial a **Pilar Mendiola y Jorge de Costa**, por darme la oportunidad de iniciarme en lo que era y sigue siendo mi sueño desde niño, la investigación. Ellos me aceptaron como alumno interno desde el primer momento y me enseñaron valores que siguen estando en mi mente hoy día. Además me pusieron de compañero de **Pedro Almada**, un increíble investigador y mejor persona al que mi admiración no hace más que crecer con cada día que pasa.

A **Vane** y a **Mar**, que además de mis compañeras de piso y grandes amigas, aportaron su granito de arena en el departamento, ayudándome en mi investigación y apoyándome en todo momento. Gracias por haber estado ahí en ese momento de mi vida y seguir estando a mi lado por muy lejos que os encontréis.

A todos mis amigos, **José Ramón, María, Rafa, Elena, Manolo, Bea, Paco, Conchi, Mariajo, Laura** y un largo etcétera que siempre me han animado seguir cuando estaba pensando en dejarlo todo. Con personas así, la vida es mucho más fácil y agradable. Y aunque muchos de ellos hayan tenido que emigrar para buscarse la vida, siempre los siento junto a mí.

Y sobre todo a **mi familia**. Ellos son los artífices de todo esto. Sin los valores que me han enseñado e inculcado, sin el cariño y el interés que siempre han mostrado conmigo, yo no estaría aquí en este momento. No tengo palabras para describir lo que significan para mí. No habría papel suficiente para escribir todo lo que siento por ellos.

Por último quiero agradecer a la Fundación Séneca, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia por la financiación aportada en los proyectos 05741/PI07, 04542/GERM06 and 04543/GERM06 que han permitido la realización de la presente tesis doctoral.

ÍNDICE

INDEX

	<u>Pag.</u>
1-. Introducción General	1
2-. Objetivos	9
3-. Resumen general	13
3.1-. Material y métodos	15
3.2-. Diseño experimental y resultados	20
4-. Conclusiones generales	39
1-. General Introduction	43
2-. Objectives	51
3-. Extended Summary	55
3.1-. Material and methods	57
3.2-. Experimental design and results	62
4-.General Conclusions	79
5-. Artículos/ Articles	83
5.1-. Artículo 1/ Article 1	85
5.2-. Artículo 2/ Article 2	89
5.3-. Artículo 3/ Article 3	93
6-. Bibliografía/ References	97
7-. Resumen corto / Abstract	111

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la naturaleza hay especies animales que, en cierta época del año, pierden su capacidad reproductora. Este fenómeno se conoce como reproducción estacional y es una estrategia utilizada para asegurar un mayor éxito reproductor. La duración del día es uno de los factores más importantes en estos animales que regula la reproducción estacional. En función de ello, podemos distinguir entre animales cuya época reproductora es en días largos y otros cuya época reproductora es en días cortos (Gerlach & Aurich 2000). Durante la época no reproductora se ha observado que se produce una pérdida de la fertilidad acompañada, en muchos casos, con un descenso del peso testicular y del diámetro del túbulo seminífero (Lincoln GA, 1981). Diversos estudios han mostrado la existencia de diferentes estrategias de detención de la espermatogénesis en estos animales de reproducción estacional durante la época no reproductora. Una primera estrategia consiste en la reducción de la espermatogénesis aunque manteniendo todas las líneas de células germinales como ocurre en el carnero (Hochereau-de Reviers et al., 1985, 1992), el ciervo (Hochereau-de Reviers & Lincoln, 1978), el potro (Berndtson et al., 1983) o la rata topo (Gottreich et al., 1995). Una segunda estrategia es la detención de la espermatogénesis con paradas en espermatocitos y espermátidas observándose microscópicamente secciones tubulares donde la espermatogénesis alcanza como máximo el estado de espermátidas redondas. Esto ocurre en el corzo (Schön et al., 2004), el oso negro (Tsubota et al., 1997), el topillo rojo (Tähkä et al., 1997), el perrito de las praderas (Foreman D, 1997), la ardilla (Barnes et al., 1986) o la liebre (Simeunovic et al., 2000). Por último, una tercera estrategia es la detención de la espermatogénesis en un estado donde los túbulos seminíferos están únicamente formados por espermatogonias y células de Sertoli como ocurre con el pichi peludo (Luaces et al., 2013), el visón (Pelletier RM, 1986; Blottner et al., 2006) y el murcielago (Araujo et al., 2013). Esta tercera estrategia también tiene lugar en aves como el avestruz (Madedkurozwa et al., 2002) o el cuervo de la selva (Islam et al., 2010). En el hámster sirio (roedor) la regresión testicular tiene lugar en la época de fotoperiodo corto e histológicamente esta especie se puede encuadrar en los animales que presentan la segunda estrategia mencionada.

Para que la espermatogénesis se produzca correctamente debe existir un equilibrio entre la proliferación y diferenciación de espermatogonias y la muerte por apoptosis de las células germinales. (De Kretser & Kerr, 1994; Blanco-Rodríguez & Martínez-García, 1996; Loveland & Schlatt, 1997). Las espermatogonias, que son células germinales diploides localizadas en la zona más próxima a la membrana basal de los

túbulos seminíferos, proceden de la división de las células madre de espermatogonias (SSC). Al igual que otras células madre, las SSC se definen por su capacidad para mantener el equilibrio entre su autorrenovación y su diferenciación en espermatogonias. Este equilibrio es esencial para mantener el pool de SSC y responder a la necesidad de más espermatogonias manteniendo el funcionamiento normal del testículo (Phillip et al., 2010). Además, para que la espermatogénesis tenga lugar de forma correcta, es esencial el buen funcionamiento de las células de Sertoli. Éstas son células somáticas con una morfología normalmente columnar y polarizada cuyas funciones son, entre otras, servir como soporte para las células germinales suministrando nutrientes y actuando como mediadora de señales externas necesarias para el mantenimiento de la espermatogénesis (Griswold MD, 1998) además de jugar un papel esencial en la regulación de la diferenciación de estas células (Cheng & Mruk 2002). Otra de las funciones esenciales de las células de Sertoli en el epitelio seminífero es la de actuar como célula fagocítica para eliminar los restos de espermátidas y de células germinales apoptóticas que aparecen durante la espermatogénesis (Blanco-Rodriguez et al., 1999; O'Donnell et al., 2011). Así mismo, también en situaciones en las que tiene lugar una lesión del epitelio seminífero ha sido descrita la fagocitosis de espermátidas (Kerr et al., 1993). Una característica que ha sido siempre considerada sobre la célula de Sertoli es que se trata de una célula totalmente diferenciada y quiescente (Sharpe et al., 2003). Junto a esto, es sabido que en diversas especies animales incluidos el hombre (Xia et al., 2012) y la rata (Ramos & Dym, 1979) su número no varía en el adulto, variando el número de células de Sertoli únicamente durante el desarrollo postnatal (Berensztein et al., 2002, Hayashi et al., 2002) hasta alcanzar un número estable durante el resto de la vida adulta. También en situaciones patológicas, que tiene como consecuencia el deterioro del epitelio seminífero, las células de Sertoli mantienen un número constante aunque sufran grandes alteraciones citoplasmáticas (Pinart et al., 2000; Nistal et al., 2001).

El otro fenómeno implicado en el mantenimiento del equilibrio en la espermatogénesis es la apoptosis la cual es un proceso de muerte celular programada que está asociado a cambios morfológicos como son la reducción del volumen celular, condensación y marginación de la cromatina, formación de vesículas en la membrana plasmática y la formación de los llamados cuerpos apoptóticos. Otra característica asociada a la apoptosis es la rápida eliminación de las células muertas por parte de células con capacidad fagocítica antes de que el contenido de estas células muertas sea liberado al exterior provocando una reacción inflamatoria (Sinha-Hikim & Swerdloff

1999). En muchos mamíferos como la rata (Hikim et al., 1995, Sinha-Hikim et al., 1997), el hámster (Lue et al., 1997) y el hombre (Hikim et al., 1998), durante el proceso normal de espermatogénesis, se ha observado la muerte por apoptosis de células germinales de forma espontánea a lo largo de diversas etapas de su desarrollo. Tanto en la rata como en el hámster sirio se ha observado apoptosis espontánea de espermatogonias y espermatocitos durante la división meiótica. En el caso del ratón, la apoptosis de espermatocitos es más comúnmente observada, menos frecuente en espermatogonias y muy rara en espermátidas. (Sinha-Hikim & Swerdloff, 1999).

Durante la formación y maduración de los espermatozoides se han observado cambios en el patrón de glucoproteínas en numerosas especies (Nicolson et al., 1977; Schwarz & Koehler, 1979). Para el estudio de los patrones de glucoproteínas han sido muy ampliamente utilizadas las lectinas. Éstas, son proteínas de origen microbiano, vegetal (plantas), fúngico (hongos) y animal que reconocen específicamente los residuos de azúcar de glicoproteínas y glucolípidos, que muestran un patrón de unión característico que define los glucoconjugados de órganos o tejidos estudiados (Spicer SS, 1993). Estas proteínas han sido ampliamente utilizadas en la caracterización “in situ” (histoquímica de lectinas) de patrones específicos de carbohidratos en diversos tejidos y órganos, por ejemplo, el sistema respiratorio (Castells et al., 1990; Pastor et al., 1992, 1994; Kasper & Singh 1995), el sistema digestivo (Pérez-Tomás et al., 1990; Madrid et al., 1997, 1998), y sistemas reproductores masculino (Calvo et al., 1995, 2000; Pinart et al., 2001; Badía et al., 2005; Morales et al., 2005) y femenino (Avilés et al., 1994, 2000; Pastor et al., 2008), o en diversas situaciones patológicas (Roth et al., 1996). Los cambios en estos patrones pueden ser estudiados en situaciones fisiológicas o patológicas, no sólo para obtener información biológica de estos procesos, sino también como marcadores específicos de los mismos (Roth et al., 2011). En el caso de estudios referentes al epitelio seminífero, mediante la utilización de la histoquímica de lectinas se ha observado un patrón de afinidad diferencial entre los diferentes tipos de células germinales y somáticas (Arya & Vanha-Perttula, 1984, 1986; Söderström et al., 1984; Kurohmaru et al., 1991, 1995, 1996; Jones et al., 1992; Martinez-Menarguez et al., 1992, 1993; Wine & Chapin, 1997; Calvo et al., 2000; Pinart et al., 2001). Los estudios sobre el patrón de glucoconjugados realizados en el testículo del hámster tanto en la época reproductora (Ballesta et al., 1991; Pastor et al., 2003) como en animales fotoinhibidos muestran alteraciones en la expresión y distribución de O y N-azúcares tanto en el túbulo seminífero, principalmente en espermatogonias y espermatocitos,

como en el intersticio testicular en hámsteres totalmente regresados (Suda et al., 1998; Pastor et al., 2003).

Pero hay animales en los que el principal mecanismo de regulación de la espermatogénesis durante la regresión testicular que tiene lugar en la reproducción estacional no es la apoptosis sino la disminución de la proliferación (Blottner et al., 2007) o la descamación de células germinales (Dadhich et al., 2013). Así mismo, semicuantitativamente se ha observado en el topo un aumento de la actividad proliferativa justo antes del periodo reproductor (Dadhich et al., 2010). Por último, desde el punto de vista cuantitativo, únicamente se ha realizado un estudio (en el hámster ruso) sobre el cambio en el número total de espermatogonias en animales sometidos a fotoperiodo corto. En dicho estudio, se ha observado un número muy inferior de estas células comparadas con los animales mantenidos en fotoperiodo largo y no se sabe si esta disminución es debida a una baja actividad proliferativa o a la muerte las mismas (Meachem et al., 2005).

El hámster sirio, a pesar de tener una estrategia reproductora similar a la liebre (Strbenc et al., 2003), el corzo (Blottner et al., 1995) o el topo (Dadhich et al., 2010), es un animal donde se considera, debido a la escasez de estudios, que la apoptosis aunque importante, no es el mecanismo principal que lleva a la regresión testicular en la estación no reproductora (Dadhich et al., 2013). En cambio, existen otras especies animales donde la apoptosis de células germinales es considerada como el mecanismo principal por el que se produce la regresión testicular. Este fenómeno de apoptosis puede afectar de forma distinta a las células germinales ya que en la liebre, la muerte por apoptosis ocurre principalmente en espermatocitos y raramente en espermatogonias (Strbenc et al., 2003). En cambio en el caso del ratón de pies blancos, del estornino (Young & Nelson, 2001) o del cuervo (Jenkins et al., 2007; Islam et al., 2012), la apoptosis ocurre, además de en espermatocitos, en espermátidas y en menor medida en espermatogonias. En el caso del hámster sirio solo se sabe que la apoptosis de espermatocitos es esencial para mantener la regresión testicular una vez que ésta se ha establecido (Morales et al., 2002).

Además, los estudios comparativos entre el ratón de pies blancos y el estornino han mostrado patrones diferentes de regresión testicular en el epitelio seminífero ya que en el caso del estornino, además de las células germinales, se produce muerte por apoptosis de células de Sertoli mientras que en el ratón de pies blancos este fenómeno no se observa. Este hecho ha llevado a proponer dos modelos de regresión testicular según

afecte o no a las células de Sertoli (Young & Nelson, 2001). Así mismo, este fenómeno de muerte de células de Sertoli también ha sido observado posteriormente en otras aves como el cuervo (Jenkins et al., 2007; Islam et al., 2012) mientras que en el hámster ruso, donde se ha observado un descenso cuantitativo de células de Sertoli en animales totalmente regresados, no se han dado evidencias del mecanismo por el que se produce dicha pérdida (Meachem et al., 2005). Este último estudio contrasta con el realizado en el hámster sirio donde, con anterioridad, se ha observado que el número de células de Sertoli no varía en animales totalmente regresados (Sinha-Hikim et al., 1988). Todos estos estudios que muestran pérdida de células germinales y de Sertoli han utilizado entre otras, la técnica de TUNEL para identificar células apoptóticas además de corroborar dichos resultados con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Junto a ella, para el estudio de la apoptosis de células tanto somáticas como germinales, la técnica histoquímica de lectinas también ha sido utilizada recientemente en peces, identificando el patrón de glucoconjugados en las células que entran en apoptosis (Liguoro et al., 2004). En el caso del epitelio seminífero en el hámster sirio, no hay estudios sobre la relación existente entre los cambios en el patrón de glucoconjugados, que tiene lugar a nivel de la membrana plasmática, y la muerte por apoptosis de células germinales en animales totalmente regresados. Únicamente se ha barajado la posibilidad de que estos cambios podrían estar relacionados con la muerte por apoptosis (Pastor et al., 2003).

De todo lo anteriormente mencionado se puede concluir que: A) Existe una cierta controversia sobre el papel de la proliferación y la apoptosis en la regresión testicular que tienen lugar en el epitelio seminífero durante la reproducción estacional. En concreto, en el hámster sirio se considera que la apoptosis tiene un papel en el mantenimiento de la regresión ya establecida pero se desconoce si juega o no un papel importante durante el proceso de la misma. B) Aunque es bien conocido que el testículo sufre modificaciones importantes en su estructura (regresión testicular) durante la estación no reproductora y especialmente debida a un fotoperiodo corto, no se ha estudiado con detalle las mismas a nivel microscópico durante todo el proceso de regresión. C) La histoquímica de lectinas es útil para el análisis histológico e histopatológico del epitelio seminífero y es muy probable que sirva para identificar células en apoptosis aun cuando no se ha aplicado esta técnica en mamíferos para la detección de células apoptóticas sobre secciones histológicas. D) Por último, hay datos

experimentales que apuntan a una pérdida de células de Sertoli que acompaña a la de células germinales durante la regresión testicular en el hámster desconociéndose el mecanismo por el cual se produce la disminución de su número. Así mismo es conocida la capacidad de estas células de fagocitar espermátidas elongadas en condiciones fisiológicas alteradas, pero no se sabe si este fenómeno ocurre durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto.

En consecuencia, en la presente tesis doctoral se aborda en tres trabajos los aspectos arriba comentados. En el **primer artículo** se estudian tanto la dinámica proliferación/apoptosis (aspecto A) como los cambios histomorfométricos (aspecto B) durante dicha regresión testicular. En él, se muestra cómo y de qué manera se modifica la estructura histológica del testículo en la regresión y cómo proliferación y apoptosis participan en la atrofia del epitelio seminífero durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto en el hámster sirio. Un **segundo artículo** responde al aspecto "C" determinando la utilidad de la histoquímica de lectinas para la identificación de células germinales y somáticas en apoptosis utilizando como modelo el epitelio seminífero durante la regresión testicular en el hámster sirio sometido a fotoperiodo corto. Por último, un **tercer artículo** aborda la cuestión planteada en el aspecto "D" determinando si la pérdida de células de Sertoli durante el proceso de regresión testicular debida a fotoperiodo corto descrita en otras especies tiene lugar en el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) a través de apoptosis y si existe, por parte de la célula de Sertoli, fagocitosis de espermátidas elongadas durante dicho proceso.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es estudiar el proceso de regresión testicular debida a fotoperiodo corto en el hámster sirio tanto a nivel histomorfométrico como a nivel de las modificaciones de la proliferación y apoptosis celular que pueden tener lugar durante la atrofia del epitelio seminífero con el fin de aportar nueva información sobre las causas implicadas en este proceso de regresión testicular. Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1.- Realizar un estudio semicuantitativo y cuantitativo tanto de los cambios histomorfométricos que acontecen durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto como de los cambios en la proliferación y apoptosis en las células germinales durante la atrofia del epitelio seminífero determinando la importancia de estos fenómenos en ella (**Artículo 1**).

2.- Evaluar, utilizando una extensa batería de lectinas, la capacidad de detectar “*in situ*” específicamente tipos de células del epitelio seminífero en apoptosis y fase en la que se encuentran durante la regresión testicular en el epitelio seminífero del hámster sirio sometido a fotoperiodo corto (**Artículo 2**).

3.- Dilucidar, con técnicas morfológicas específicas, durante la regresión del epitelio seminífero tras la exposición a un fotoperiodo corto, si existe pérdida de células de Sertoli por apoptosis y si se produce la fagocitosis de espermátidas elongadas por parte de las células de Sertoli (**Artículo 3**).

3. RESUMEN GENERAL

3.1-. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y muestras

Se utilizaron 50 hámsteres machos de 6 meses de edad sexualmente maduros (*Mesocricetus auratus*) mantenidos inicialmente con un fotoperiodo de 14:10 h luz-oscuridad. De ellos, cinco machos de 6 meses de edad, sanos y sexualmente maduros se utilizaron como grupo de control y se mantuvieron con el mismo fotoperiodo de 14:10 h de luz-oscuridad. Los otros cuarenta y cinco animales de 6 meses de edad fueron sometidos a un fotoperiodo corto de 8:16 h de luz-oscuridad. Todos los animales se mantuvieron en animalario de la Universidad de Murcia a una temperatura ambiente de 20° C y siempre con comida y agua *ad libitum*. A las 4, 6, 8, 10 y 12 semanas se sacrificaron nueve animales tratados más un control por sobredosis de CO₂ en una cámara cerrada y los testículos fueron extraídos inmediatamente. Una parte del testículo se fijó en methacarn, una solución fijadora formada por metanol, cloroformo y ácido acético en proporción 6:3:1 respectivamente durante 8 h a temperatura ambiente antes de ser procesados e incluidos en parafina. Una vez realizados los bloques, se hicieron secciones de 5µm de espesor utilizando un micrótomos Microm HM310 (MICROM International GmbH, Walldorf, Germany) Estas secciones se usaron en varias técnicas de microscopía de óptica: hematoxilina-eosina (H&E) para los estudios semicuantitativos y morfométricos; la técnica inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para el estudio semicuantitativo y cuantitativo de la proliferación celular; la técnica histoquímica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP in situ nick end labelling. Marcaje *in situ* de DNA fragmentado), para el estudio semicuantitativo y cuantitativo de la muerte celular por apoptosis, y la técnica histoquímica de lectinas para el reconocimiento del patrón de glucoconjugados en células germinales y somáticas con apariencia apoptótica. La otra parte del testículo fue incluida y procesada para su estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Se establecieron tres grupos de regresión testicular: mild regression (MR), strong regression (SR) y total regression (TR) teniendo en cuenta no solo el tiempo de exposición a fotoperiodo corto y el peso testicular, sino otros parámetros histológicos estudiados en la presente tesis doctoral.

Ética biomédica

Este estudio se realizó de acuerdo a las normas éticas y legales vigentes en el Real Decreto Español RDL 1201/2005 del 10 de octubre y el Real Decreto Español RDL 53/2013 de 10 de octubre sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros propósitos científicos y la legislación 2010/63/UE sobre protección de los animales.

Técnica inmunohistoquímica de Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)

Las muestras se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en etanol (100, 96 y 70%) y agua destilada. La actividad peroxidasa endógena se inactivó mediante la incubación con 0,3% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) en tampón salino fosfato (PBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se incubaron con suero normal de conejo al 1,5% (Jackson Immunoresearch Europe Ltd, UK) en PBS durante 1 hora en cámara de humedad. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo PCNA (Biomeda, Foster City, CA; EE.UU.) a una dilución 1:200 en PBS que contenía 1% de suero de albúmina bovina ((BSA) Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Montana, USA) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con inmunoglobulina policlonal de conejo anti-ratón biotinilado (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:200 en PBS/BSA durante 45 minutos. Después de lavar con PBS tres veces, las muestras se incubaron con estreptavidina conjugada con HRP (peroxidasa de rábano picante) (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:300 en PBS/BSA durante 30 minutos. A continuación las muestras se lavaron en PBS tres veces y para poner de manifiesto la actividad de peroxidasa, las secciones fueron incubadas en una solución de sustrato-cromógeno que contiene 3,3 'diaminobencidina (DAB (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA)) y H_2O_2 al 0,3% hasta alcanzar una coloración marrón, momento en el que se lavaron dos veces con agua destilada. El contraste de las preparaciones se realizó utilizando hematoxilina de Mayer durante 5 segundos. Finalmente, las muestras se deshidrataron en etanol (70, 96 y 100%), se lavaron tres veces en xileno y se montaron con DPX (Prolabo®, Hermosilla, Sonora, Mexico). Las muestras fueron estudiadas con un microscopio de luz Olympus BX-51 y

las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Olympus DP-25 (Olympus, Tokio, Japan) conectada al microscopio.

Técnica histoquímica de TUNEL

Las células germinales en apoptosis se examinaron de acuerdo con el protocolo del "kit de detección de apoptosis in situ TACS TdT " (reacción TUNEL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Las muestras fueron desparafinadas en O-xileno y rehidratadas en etanol (100, 96 y 70%) y H₂O libre de DNAsas. A continuación se incubaron con proteinasa K (1 mg/ml) durante 20 minutos y posteriormente se lavaron en H₂O libre de DNAsas dos veces durante 1 minuto. La actividad peroxidasa se bloqueó con 0.3% de H₂O₂ en metanol durante 30 minutos. Una vez lavadas las muestras en H₂O libre de DNAsas dos veces durante 1 minuto, las muestras se sumergieron en tampón TdT etiquetado 1x (1M TACS Safe-TdT Buffer, 0,5 mg/ml de BSA, 0,6 mM de ácido 2-mercaptoetanosulfónico) a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se incubaron con TdT dNTP Mix (0,25 mM biotinilados dNTP), 50x Mn⁺² (1µl), TdT Enzima (1µl) y tampón TdT etiquetado 1X durante una hora a 37°C. La reacción se detuvo con tampón TdT de parada (0,1M EDTA, pH 8,0). Posteriormente, las muestras se lavaron en PBS y se incubaron con estreptavidina-HRP durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS, las muestras se tiñeron con TACS Blue Label y se incubaron con solución de contraste C (Nuclear Fast Red). Las secciones utilizadas como controles negativos, procesadas sin TdT, no mostraron marcaje positivo. Una vez deshidratadas, aclaradas y montadas, las muestras se estudiaron con un microscopio de luz Olympus BX-51 y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Olympus DP-25 conectada al microscopio.

Histoquímica de lectinas

Las muestras se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en etanol (100, 96 y 70%) y agua destilada. En el caso de las lectinas conjugadas con HRP, las muestras, después de un breve lavado durante 5 minutos en TBS (solución salina tamponada con Tris, pH 7,4), se incubaron en una solución que contiene 0,3% de H₂O₂ para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Después de 3 lavados en TBS, las secciones se incubaron con las lectinas (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA) a la dilución apropiada (Tabla 1) en una cámara de humedad a temperatura ambiente durante 1,5 h.

Después de lavar en TBS, las secciones se sumergieron en TBS que contiene 0,05% DAB (Sigma, St. Louis MO, EE.UU.) y 0,3% de H_2O_2 para poner de manifiesto los sitios que contienen actividad peroxidasa. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Harris, fueron deshidratadas, aclaradas y montadas usando DPX como medio de montaje.

Para las lectinas conjugadas con digoxigenina (DIG), las secciones fueron bloqueadas con H_2O_2 al 0,3% e incubadas en TBS con 1% de BSA durante 10 min. La incubación con las lectinas conjugadas con DIG se realizó a la concentración apropiada (Tabla 1) en una solución formada por 1% BSA, 0.05% Tween 20 y 0.05% Triton X-100 en TBS durante 1,5h a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las muestras en TBS y se incubaron con un anticuerpo anti-DIG conjugado con HRP a una dilución de 0.6U/ml en TBS durante 1h. Para demostrar la actividad peroxidasa las secciones se sumergieron en TBS que contiene 0,05% DAB (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA) y 0,3% de H_2O_2 . Posteriormente las secciones se contrastaron con hematoxilina de Harris durante 5 segundos, se deshidrataron y se montaron en DPX. Finalmente, las muestras se estudiaron con un microscopio de luz Olympus BX-51 y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Olympus DP-25 conectada al microscopio.

Estudio ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las muestras ($1mm^3$) se fijaron durante 4h en glutaraldehído al 3.5% diluido en tampón cacodilato sódico 0,1 M. Después fueron lavadas en una solución de cacodilato-sacarosa a una concentración de 0,855mg/100ml, postfijadas en solución de tetraóxido de osmio al 1% durante 2h, deshidratadas en acetona en concentración ascendente e incluidas en Epon 812 (Serva, Heidelberg, Germany). Se realizaron cortes semifinos ($1\mu m$ de espesor) que fueron teñidos con azul de toluidina. Las secciones ultrafinas se cortaron utilizando un ultramicrotomo Reichert-Imy Ultracut (Leyca Microsystems, Wetzlar, Germany) y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. El estudio ultraestructural se realizó con un microscopio electrónico Jeol-1011 (Jeol, Tokyo, Japan).

Caracterización histológica de las secciones tubulares según el grado de degeneración para los estudios cualitativo y semicuantitativo

Las secciones tubulares se clasificaron atendiendo al grado de degeneración tubular, en cuatro categorías: a) Normal, cuando el epitelio tubular contenía toda la serie completa de células germinales bien definidas (espermátidas, espermatoцитos y espermatoгонias); b) hipoespermatoгонico, cuando se observó una reducción en el desarrollo de las espermátidas tardías con una descamación ocasional de células germinales en la luz del túbulo seminífero además de un adelgazamiento del epitelio germinal; c) parada (detención) en espermátidas redondas, cuando el epitelio germinal se desarrolló hasta espermátidas redondas pero no más allá (no se observaron espermátidas elongadas o tardías) en la luz del túbulo seminífero; d) parada (detención) en espermatoцитos, cuando el epitelio germinal se desarrolló únicamente hasta espermatoцитos y no se observaron, o eran muy escasas, espermátidas redondas. La clasificación de tipos de secciones tubulares anteriormente mencionada fue utilizada para los diversos estudios realizados en la presente tesis doctoral.

Análisis estadístico

Para algunos estudios estadísticos, los datos fueron transformados logarítmicamente. Se realizó un análisis de varianza de una vía seguido de un test post-hoc contrastando la igualdad entre pares de medias, utilizando el test de diferencia media significativa (DMS) y el método de Bonferroni. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor P fue menor de 0,05. Los resultados se mostraron como la media $\pm$ el error estándar de la media en los textos, figuras y tablas. Para el estudio estadístico se utilizó el software de análisis estadístico SPSS 19 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA).

3.2-. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Objetivo 1: Realizar un estudio semicuantitativo y cuantitativo tanto de los cambios histomorfométricos que acontecen durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto como de los cambios en la proliferación y apoptosis en las células germinales durante la atrofia del epitelio seminífero determinando la importancia de estos fenómenos en ella (Artículo 1).

Diseño experimental

Estudios histológicos cualitativo y semicuantitativo y determinación de los grupos de regresión

Para establecer los grupos de regresión testicular se tuvo en cuenta no solo el tiempo de exposición a fotoperiodo corto (MR: 4 semanas; SR: 6-8 semanas; TR: 12 semanas) sino también la proporción de secciones tubulares en parada en espermatidas (Control: 0%; MR: 3.9%; SR: 42.9%; TR: 81.6%), el diámetro tubular (Control: $285.3 \pm 4.3 \mu\text{m}$; MR: $234.3 \pm 8.6 \mu\text{m}$; SR: $163.7 \pm 6.4 \mu\text{m}$; TR: $128.9 \pm 5.6 \mu\text{m}$) y el área epitelial media de sección tubular (Control: $55039.9 \pm 11254.5 \mu\text{m}^2$; MR: $34852.2 \pm 7353.9 \mu\text{m}^2$; SR: $17426.76 \pm 4830.84 \mu\text{m}^2$; TR: $10480.7 \pm 2722.2 \mu\text{m}^2$).

Para la obtención de las proporciones de secciones tubulares se realizó un estudio semicuantitativo del grado de degeneración tubular siguiendo los criterios anteriormente mencionados. Para ello se utilizaron dos secciones, de $5 \mu\text{m}$ de espesor, de cada testículo elegidas al azar y se examinaron 50 túbulos cortados transversalmente de cada sección. Mediante la clasificación de cada túbulo según su grado de degeneración se obtuvieron las proporciones de secciones tubulares de cada animal estudiado.

El área epitelial media de sección tubular (**MTSEA**), el diámetro tubular medio (**MTD**) y el diámetro luminal medio (**MLD**) fueron calculados usando cuatro secciones de $5 \mu\text{m}$ de espesor de cada testículo (observados con el objetivo 10x) aleatoriamente. De cada una de ellas, 25 secciones tubulares fueron medidas (100 secciones tubulares por cada animal). **MTSEA** se determinó automáticamente al dibujar el perímetro tubular. **MTD** se determinó tomando la media de dos medidas hechas en forma de cruz para cada sección tubular. **MLD** se determinó dibujando el perímetro luminal de cada

sección tubular. Para el estudio de estos parámetros semicuantitativos se utilizó el programa de análisis de imagen Motic Images Plus 2.0 (Motic, Wetzlar, Germany).

Estudio histomorfométrico cuantitativo

Los testículos fueron pesados inmediatamente después de su extracción usando una balanza Mettler PS 360 (Mettler-Toledo, L'Hospitalet de Llobregat, Spain). El volumen testicular (V_T) se determinó considerando la densidad del testículo fresco (ρ) de 1,037g/cm³ (Hikim et al., 1988) y el peso testicular (T_w) ($V_t = \rho / T_w$).

Para el estudio histomorfométrico se utilizaron cuatro secciones de 5 μ m de espesor teñidas con hemtaoxilina-eosina. De cada una de las secciones se seleccionaron 30 campos al azar y las siguientes variables fueron calculadas utilizando el software de análisis de imagen Micron Leica Qwin (Leyca Microsystems, Wetzlar, Germany): (1) la densidad de volumen de túbulos seminíferos (VD_{ST}), como la ratio entre la superficie de túbulos seminíferos/área de referencia (798266.63 μ m²); (2) la densidad de volumen de intersticio testicular (VD_{TI}), como la ratio de superficie intersticial/área de referencia (798266.63 μ m²); (3) el volumen total de túbulo seminífero por testículo (V_{ST}) multiplicando $VD_{ST} \times V_T$; (4) la longitud de túbulo seminífero por unidad de volumen (L_v) utilizando la fórmula establecida: $L_v = VD_{ST} / \pi R^2$ (Wing & Christensen, 1982; Santamaria et al., 1995). Además, para la longitud total del túbulo seminífero (L_{ST}), se asume que todos los túbulos forman un único cilindro de longitud L, radio R (MTD/2) y un volumen V_{ST} . Así, L_{ST} se calculó como $L_v \times V_T$; (5) el área tubular total (**TTA**), como $2\pi R \times L_{ST}$; (6) El volumen total de epitelio seminífero (V_{SE}), multiplicando $MTSEA \times L_{ST}$; (7) el volumen de intersticio testicular (V_{TI}), multiplicando $VD_{TI} \times V_T$ y (8) el volumen de luz tubular (V_{TL}), calculado multiplicando $MLD \times L_{ST}$.

Evaluación semicuantitativa del estudio inmunohistoquímico

Para el estudio de la proliferación se utilizó la técnica inmunohistoquímica de PCNA ya descrita. Con esta técnica se ponen de manifiesto células que se encuentran en fase G1/S o G2 del ciclo celular. En el epitelio seminífero es conocido que las únicas células germinales que proliferan son las espermatogonias por lo que las únicas células contabilizadas como positivas fueron este tipo celular. Para el recuento de las espermatogonias positivas, se utilizaron 4 secciones al azar seleccionando 25 campos al

azar (tamaño de campo= 0.0273mm^2). Las imágenes de los campos fueron tomadas en un microscopio de luz Olympus BX-51 utilizando el objetivo de 40x. La actividad proliferativa se determinó contabilizando el número de espermatogonias positivas x 100/total de espermatogonias (positivas + negativas) obteniéndose así el índice de proliferación (PI) de espermatogonias.

Evaluación semicuantitativa de la actividad apoptótica usando la técnica histoquímica de TUNEL

El estudio de la actividad apoptótica del epitelio seminífero en el hámster sirio sometido a fotoperiodo corto se realizó utilizando la técnica histoquímica de TUNEL. Para el recuento de los diversos tipos de células germinales en apoptosis, se utilizaron 4 secciones testiculares al azar de cada animal. De cada una de ellas, se escogieron 25 campos (tamaño de campo= 0.0273mm^2) y se contabilizaron *in situ* el número de espermatogonias, espermátocitos y espermátidas redondas TUNEL + y totales (positivas + negativas). Para la identificación de cada tipo celular se tuvo en cuenta tanto la forma de la célula como su posición relativa en el túbulo seminífero. Con estos valores se pudo calcular el índice de apoptosis (AI) de cada tipo celular como el número de tipo de célula germinal TUNEL + x 100/número total de cada tipo célula germinal (positiva + negativa). Así se calcularon los AI de espermatogonias, espermátocitos y espermátidas redondas.

Una vez obtenidos PI y AI, se procedió al estudio de la relación existente entre ambos procesos durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto. Así, se estudiaron las siguientes relaciones: AI de espermatogonias/PI de espermatogonias, AI de espermatogonias + espermátocitos/PI de espermatogonias y AI de espermatogonias + espermátocitos + espermátidas redondas/PI de espermatogonias.

Estudio cuantitativo de las actividades proliferativa y apoptótica

Para el estudio cuantitativo fue necesaria la determinación de la densidad de volumen de células germinales (Vd) mediante la aplicación de la ecuación de Floderus (Floderus S, 1944; Morales et al., 2003), donde $N_v = N_a / (D + t - 2h)$. **N_a** es el número de núcleos por unidad de área de testículo (mm^2) (datos obtenidos del estudio semicuantitativo de la apoptosis). **D** es el diámetro medio del núcleo de cada tipo de célula germinal,

tomado como el valor medio de 50 núcleos celulares de cada tipo de célula germinal, t es el espesor de la sección (5 μ m) y h es $D \times 0.1$

El número de las espermatogonias proliferantes totales y el número total de espermatogonias, espermatocitos y espermatídas redondas apoptóticas y no apoptóticas durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto fueron obtenidos multiplicando Vd (obtenida con la ecuación de Floderus) $\times Vt$. Para las espermatogonias proliferantes totales Na (de la ecuación de Floderus) se obtuvo a partir del estudio semicuantitativo de la actividad proliferativa.

Resultados

Estudio histomorfométrico de la regresión testicular

Estudio histológico cualitativo y semicuantitativo

La histología del túbulo seminífero de los grupos establecidos difirió en cuanto al tipo de sección tubular predominante (diferentes grados de degeneración epitelial). Así, en los testículos del grupo Control (animales no sometidos a un fotoperiodo corto) se observaron mayoritariamente secciones tubulares normales, con la espermatogénesis completa, y algunas secciones hipoespermatogénicas mostrando una luz más amplia. En el grupo MR se observó que prevalecían las secciones tubulares hipoespermatogénicas con la aparición de secciones tubulares en parada en espermatídas redondas y espermatocitos. En el grupo SR desaparecieron las secciones tubulares normales y observándose una escasa proporción de secciones tubulares hipoespermatogénicas además de un aumento de las secciones en paradas en espermatocitos y espermatídas redondas. Por último, el grupo TR se caracterizó por la presencia de secciones tubulares en parada en espermatocitos y, en algunos casos, paradas en espermatídas redondas. Semicuantitativamente, en estos grupos se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) de secciones tubulares normales entre el grupo Control (76%) respecto a los grupos MR (26.45%) y SR (3.13%). Por el contrario, las secciones tubulares hipoespermatogénicas sufrieron un aumento significativo ($P < 0.05$) desde el grupo Control (24%) al grupo MR (61.36%) descendiendo significativamente ($P < 0.05$) en el grupo SR (6.13%). Las secciones tubulares hipoespermatogénicas fueron sustituidas por secciones de túbulos en parada en espermatídas redondas ya que fue significativo el

aumento de estos tipos tubulares ($P<0.05$) desde el grupo MR (12%) al grupo SR (47.63%) descendiendo en el grupo TR (18.4%). Finalmente, las secciones tubulares en parada en espermatidas redondas fueron sustituidas por secciones tubulares en parada en espermátocitos observándose la aparición de este tipo tubular ya en el grupo MR (0.18%) y un aumento significativo ($P<0.05$) en el grupo SR (43.13%), llegando a ser mayoritario en el grupo TR (81.6%).

El diámetro tubular medio (MTD) y el área media de sección de epitelio tubular (MTSEA) sufrieron un descenso significativo ($p<0.05$) en los grupos MR, SR y TR respecto del grupo Control. Junto con esto, se observó que el diámetro luminal medio (MLD) descendió significativamente ($p<0.05$) en los grupos SR y TR.

Estudio histomorfométrico cuantitativo

Respecto al peso testicular se observó un descenso significativo ($P<0.05$) en los tres grupos de regresión, MR, SR y TR respecto del grupo Control. Además, se observó una disminución significativa ($P<0.05$) en V_T , V_{SE} , V_{ST} y TTA en los tres grupos de regresión respecto del grupo Control ($p<0.05$). V_{TL} y V_{TI} mostraron un descenso significativo ($P<0.05$) en los grupos SR y TR mientras L_{ST} únicamente sufrió un descenso significativo ($p<0.05$) en el grupo SR manteniéndose en el grupo TR. En la Figura 1 se resumen los cambios morfométricos durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto.

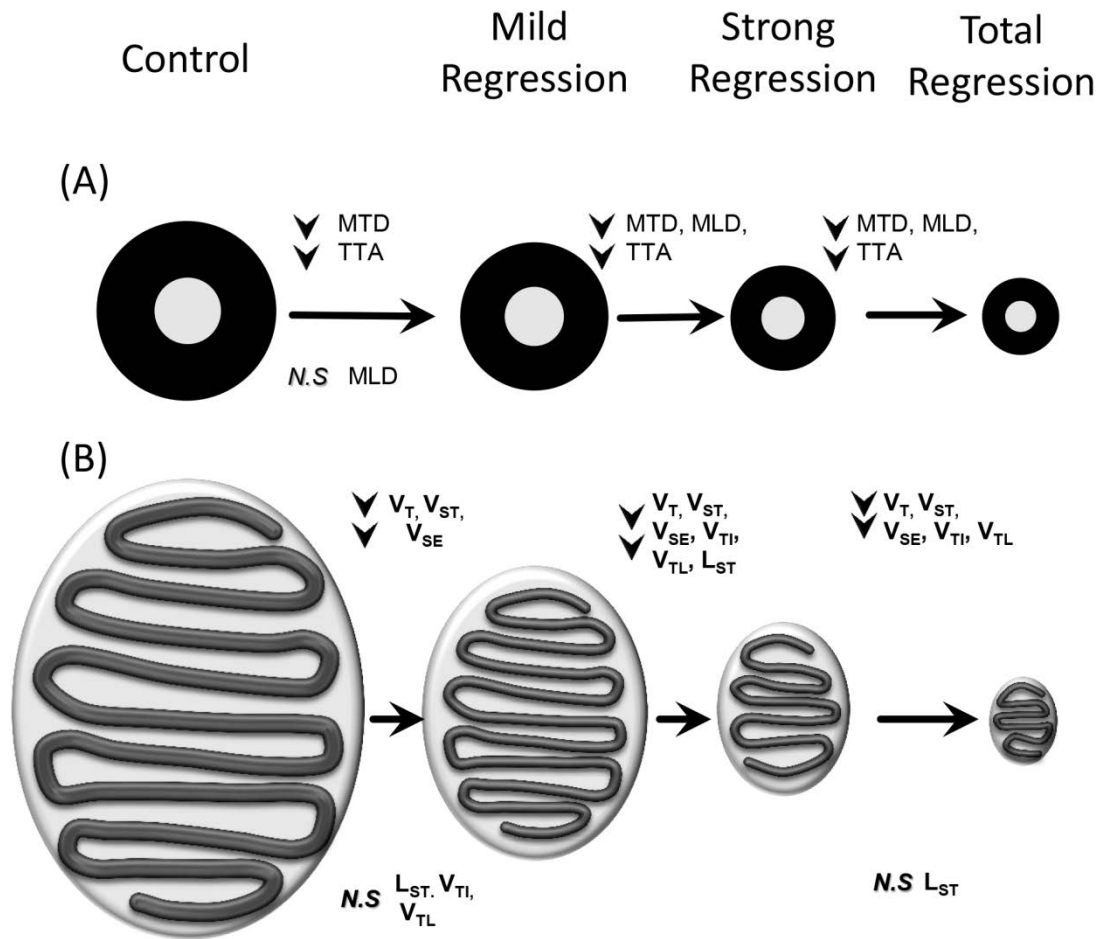


Figura 1. Esquema de los cambios morfométricos que tienen lugar en el testículo del hámster sirio durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto. **A)** Representación a escala de una sección transversal de un túbulo seminífero donde se muestran el epitelio seminífero (negro) y la luz tubular (gris). **B)** Representación esquemática a escala de una sección longitudinal del testículo mostrando las variaciones sufridas en los grupos de regresión tanto en el túbulo seminífero como en el intersticio.

N.S.: No statistical significance. **MTD:** Mean Tubular Diameter. **MLD:** Mean Lumen Diameter. **TTA:** Total Tubular Area. V_T : Testicular Volume. V_{ST} : Volume of Seminiferous Tubule. V_{SE} : Volume of Seminiferous Epithelium. V_{TI} : Volume of Testicular Interstitium, V_{TL} : Volume of Tubular Lumen L_{ST} : Length of Seminiferous Tubule

Proliferación y apoptosis durante la regresión testicular en el epitelio seminífero debida a fotoperiodo corto

Estudio semicuantitativo de la proliferación y la apoptosis

La identificación de las espermatogonias en proliferación se realizó mediante la técnica de PCNA que diferenciaba entre espermatogonias PCNA +, con una coloración nuclear marrón, y las espermatogonias PCNA – con una coloración azul típica del contraste con hematoxilina. Con esta técnica no se observaron células de Sertoli proliferantes. Por otro lado, la técnica de TUNEL permitió la identificación de células

germinales en apoptosis debido a la intensa coloración negra que adquieren las células positivas. Con esta técnica también se observaron células de Sertoli TUNEL +. Así, según el tamaño y posición relativa en el epitelio seminífero fue posible la identificación de los diferentes tipos de células germinales en apoptosis.

El índice de proliferación (PI) de espermatogonias fue significativamente inferior ($P<0.05$) en el grupo de MR respecto del grupo Control, recuperándose paulatinamente a partir del grupo de SR hasta el grupo de TR donde alcanzó valores similares al grupo Control.

En relación a la muerte por apoptosis de las células del epitelio germinal, los índices de apoptosis (AI) de espermatídas redondas y de espermatocitos fueron significativamente superiores ($P<0.05$) en los grupos SR y TR comparados con el grupo Control. En cambio, el AI de espermatogonias fue significativamente superior ($P<0.05$) en el grupo MR manteniéndose en el grupo SR y volviendo a valores similares al del grupo Control en el grupo TR. Cuando se estudió la actividad apoptótica de espermatogonias + espermatocitos se observó un incremento significativo ($P<0.05$) desde el grupo MR hasta el grupo TR. Finalmente, cuando el AI de todas las células germinales en su conjunto fue examinado, se observó la mayor actividad apoptótica en el grupo SR. El nivel de actividad alcanzado se mantuvo constante en el grupo TR.

Con los resultados de proliferación y apoptosis obtenidos anteriormente, se estudió la relación entre ambos fenómenos durante el proceso de regresión testicular. Así, se observó que la relación entre el AI de espermatogonias/PI de espermatogonias fue significativamente mayor ($P<0.05$) en los grupos MR y SR respecto del grupo Control volviendo a valores normales en el grupo TR. En cuanto a la relación entre el AI de espermatogonias + espermatocitos/PI de espermatogonias se observó un aumento significativo ($P<0.05$) durante todo el proceso de regresión testicular. En la relación entre el AI de espermatogonias + espermatocitos + espermatídas redondas/PI de espermatogonias se observó un incremento significativo ($P<0.05$) en los grupos MR y SR comparado con el grupo Control disminuyendo en TR a niveles del grupo MR.

Estudio cuantitativo de la actividad proliferativa y apoptótica

El número total de espermatogonias que se encontraban en proliferación durante el proceso de regresión testicular debida a fotoperiodo corto fue significativamente menor ($P<0.05$) en los grupos MR y SR comparado con el grupo Control mientras que el descenso no fue significativo entre los grupos SR y TR. Respecto a la apoptosis durante el proceso de regresión testicular debida a fotoperiodo corto se observó un aumento significativo ($P<0.05$) en el número de espermátidas redondas apoptóticas en los grupos MR y SR respecto del grupo Control acompañado de un descenso significativo ($P<0.05$) en el grupo TR.

En cuanto a los espermátocitos apoptóticos, su número fue significativamente mayor ($P<0.05$) que en el grupo Control, en los grupos MR y SR descendiendo a valores similares al grupo Control en el grupo TR. En el caso de las espermatogonias apoptóticas, se produjo un aumento significativo ($P<0.05$) en el grupo MR (comparado con el Control), que descendió a valores similares al grupo Control en el grupo SR y que alcanzó valores significativamente inferiores ($P<0.05$) en el grupo TR. En términos generales, se produjo un aumento significativo ($P<0.05$) en el número de células germinales apoptóticas en los grupos MR y SR volviendo a valores similares al grupo Control en el grupo TR.

Respecto al número total de espermatogonias por testículo durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto, sufrieron solo un descenso significativo ($P<0.05$) en los grupos MR y SR respecto del grupo Control. El número total de espermátidas redondas y espermátocitos por testículo sufrió un descenso significativo ($P<0.05$) en todos los grupos respecto al Control. Finalmente, el número total de células germinales estudiadas fue significativamente inferior ($P<0.05$) en todos los grupos comparado con el grupo Control.

Estudio con MET

La apoptosis de los diferentes tipos de células germinales durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto observada con microscopía de luz como células TUNEL + fue confirmada mediante MET. Así, las espermatogonias situadas en posición basal y estrechamente relacionadas con sus células adyacentes sufrieron

inicialmente una pérdida de adhesión a las células vecinas, además de la condensación de la cromatina en la periferia nuclear, aunque los orgánulos citoplasmáticos no se vieron muy alterados. Finalmente, se observó la degradación total del núcleo acompañado de la degeneración total del citoplasma.

Los espermatoцитos, especialmente en fase de leptotene-paquitene, al igual que las espermatogonias inicialmente se separaron de las células adyacentes mientras que tenía lugar la condensación de la cromatina en el interior del núcleo. Sin embargo, esta condensación nuclear fue acompañada de la vacuolización y degeneración citoplasmática que llevó finalmente a una vacuolización total de la célula antes de destruirse completamente.

Por último, las espermátidas redondas en fase Golgi o capuchón sufrieron inicialmente una condensación nuclear especialmente en la zona central del núcleo además de una degeneración citoplasmática generalizada. En las últimas fases de la apoptosis, se produjo una contracción celular, acompañada de la deformación total del núcleo y la total condensación de la cromatina junto con la vacuolización citoplasmática. Restos celulares apoptóticos fueron encontrados en las células de Sertoli en todos los grupos de estudio.

Objetivo 2: Evaluar, utilizando una extensa batería de lectinas, la capacidad de detectar “*in situ*” específicamente tipos de células del epitelio seminífero en apoptosis y fase de la misma en la que se encuentran, durante la regresión testicular en el epitelio seminífero del hámster sirio sometido a fotoperiodo corto (Artículo 2).

Diseño experimental

Para la realización del siguiente experimento se tuvieron en cuenta los grupos de regresión testicular anteriormente establecidos. Las lectinas (PNA, SBA, HPA, LTA, Con-A, UEA-I, WGA, DBA) conjugadas con peroxidasa de rábano (HRP), el suero de albúmina bovina (BSA) y la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) fueron adquiridas de la empresa SIGMA (St. Louis MO, USA) y lectinas marcadas con digoxigenina (DIG) (MAA, GNA, AAA, SNA) se obtuvieron de la empresa Boehringer (Barcelona, Spain). Los nombres comunes, especificidad de azúcares y concentraciones de las lectinas se muestran en la Tabla 1.

Table 1: Concentración, especificidad y azúcares inhibitorios de las lectinas utilizadas en el presente estudio.

Taxonomic name	Acronym	Concentration	Specificity	Inhibitory sugar
<i>Galanthus nivalis</i>	GNA	10 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Man α 1,3-Man-	Methyl - α -Man
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con-A	20 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -D-Man > α -D-Glc	Methyl- α -Man
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	20 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -D-GalNAc	NAc D-Gal NAc (0.4 M)
<i>Glycine max</i>	SBA	12 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -D-GalNAc > β -D-Gal	NAc D-Gal NAc
<i>Helix pomatia</i>	HPA	12 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -D-Ga NAc α 1,3-Gal	NAc D-Gal NAc
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	6 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Gal β 1,4-GlcNAc β 1 > GlcNAc β 1 > Neu5Ac	D-Glc NAc (0.7 M)
<i>Arachis hypogea</i>	PNA	12 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Gal β 1,3-GalNAc α 1	β -D-Gal (0.4 M)
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	25 $\mu\text{m ml}^{-1}$	L- Fuc α 1,2-Gal β 1,4-GlcNAc β 1-	L-Fuc
<i>Aleuria aurantia</i>	AAA	15 $\mu\text{m ml}^{-1}$	L-Fuc α 1-6-	L-Fuc
<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA	25 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -L-Fuc	L-Fuc
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	15 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Neu5Ac α 2,3-Gal β 1,4-Glc NAc β 1	Neuraminic acid lactose
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	15 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Neu5Ac α 2,6-Gal/Gal NAc	Neuraminic acid lactose

Abreviaciones: Fuc, fucosa; Gal, galactosa; Gal NAc, N-acetil-galactosamina; Glc, glucosa; Glc NAc, N-acetil-glucosamina; Man, manosa; Methyl- α -Man, metil alfa manosa; Neu5Ac, Ácido Neuramínico.

Para evaluar la afinidad específica de las lectinas, se utilizaron los siguientes controles: (1) Preabsorción de las lectinas con sus correspondientes azúcares inhibitorios a una concentración de 0,2M (excepto para aquellos que usaban una concentración diferente especificada en la Tabla 1); y (2) sustitución de la lectina conjugada por TBS para determinar la presencia de actividad peroxidasa endógena.

Para el estudio cualitativo del patrón de expresión de las lectinas, se utilizaron 4 secciones testiculares al azar de cada animal. De cada una de ellas, se escogieron 25 campos al azar donde se observaban secciones tubulares totales o parciales. Para ello las imágenes fueron captadas con una cámara digital Olympus DP-25 conectada al microscopio de luz Olympus BX-51.

Resultados

De todas las lectinas examinadas, PNA, GNA, AAA, Con-A, HPA y LTA mostraron una fuerte positividad en las células del epitelio seminífero que presentaban características morfológicas de células en apoptosis: condensación nuclear, fragmentación nuclear o separación entre células vecinas.

Con PNA, además del patrón normal de expresión de glucoconjugados en el epitelio testicular, observamos secciones tubulares en parada en espermatidas en el grupo MR donde aparecieron espermátocitos en paquitene con un citoplasma moderadamente marcado y un fuerte grado de condensación de la cromatina nuclear comparado con espermátocitos normales en el mismo grupo. En estas secciones tubulares en parada en espermatidas, fue posible identificar espermátocitos en estadios tempranos de apoptosis y en diferentes estados de desarrollo debido a una incrementada compactación de la cromatina y una mayor afinidad por PNA. En el grupo SR este fenómeno se volvió más evidente, con un aumento en espermátocitos apoptóticos que continuó observándose en los animales totalmente regresados. En el grupo SR fue particularmente significativo que, en secciones en parada en espermatidas, las espermatidas redondas mostraron un citoplasma fuertemente positivo comparado con el Control. PNA también identificó espermatidas con el acrosoma deformado tanto en el grupo MR como en SR. Además se observó una positividad incrementada en el citoplasma en células en apoptosis. Este hecho fue más notorio en el grupo SR y continuó observándose en el grupo TR a pesar de la escasa presencia de este tipo celular.

En lo que respecta a la GNA, se observó que la positividad fue muy elevada en espermátocitos del grupo MR pero solo en estados de apoptosis muy avanzada comparado con el grupo Control. Esta positividad fue particularmente evidente a nivel citoplasmático. Además, se pudo observar un alto grado de compactación nuclear especialmente en espermátocitos en preleptotene. En estados más avanzados de

apoptosis, esta positividad fue más evidente en espermatocitos, hecho que se continuó en los grupos SR y TR. El hecho que la GNA no sea un fuerte marcador de espermatidas redondas en el grupo Control ayudó a identificarlas cuando comenzaban a degenerar ya que exhibían un fuerte marcaje tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática, confirmando su entrada en apoptosis. Esta positividad fue más intensa en el grupo SR manteniéndose en el grupo TR.

Otra lectina que fue capaz de marcar células germinales en apoptosis fue la AAA. En el grupo Control el marcaje con esta lectina fue débil en el citoplasma de espermatocitos y espermatidas. Debido a esto, fue posible identificar espermatocitos paquitene desde estados iniciales de apoptosis ya que la afinidad de esta lectina en el citoplasma de células apoptóticas fue más intensa haciendo posible observar diferentes estados de apoptosis en la misma sección tubular. También fue posible identificar espermatocitos zigotene en apoptosis con un citoplasma fuertemente teñido. Este fenómeno fue observado en el epitelio seminífero de todos los grupos. Además, observamos que AAA solo marcó espermatidas redondas en un avanzado estado de apoptosis además de cuerpos apoptóticos derivados de ellos. Este fenómeno fue únicamente detectable en los grupos SR y TR mientras que en el grupo MR esta variación del marcaje no fue observado o fue muy tenue.

HPA, una lectina que tiñe débilmente espermatocitos y algo más fuertemente espermatidas tardías y espermatozoides en el grupo Control, produjo una fuerte tinción en la membrana plasmática y el citoplasma de espermatocitos, tanto en paquitene como en zigotene, durante los estados iniciales de apoptosis. Con esta lectina, también fue posible identificar espermatidas tempranas, apenas marcadas en los controles, que adquirieron un fuerte marcaje citoplasmático cuando entraban en apoptosis y que se acompañaban, en algunos casos, de la aparición de deformaciones acrosomales. Este fenómeno se hizo más evidente en el grupo SR.

Con-A tiñó el citoplasma de espermatocitos más fuertemente en el grupo MR que en el grupo Control. Esta tinción fue evidente incluso en estados moderadamente avanzados de apoptosis, cuando la cromatina se encontraba algo más condensada que en espermatocitos normales. Este fuerte marcaje citoplasmático continuó hasta estados más avanzados de apoptosis donde la cromatina se encontró fuertemente condensada. Además, este fenómeno se dio durante la regresión testicular hasta el estado de

regresión total. Por otro lado, las espermátidas redondas, cuyo marcaje con Con-A en el grupo Control fue bastante débil, se volvieron fuertemente positivas en estadios iniciales de apoptosis pero únicamente en el grupo SR. Este fuerte marcaje se mantuvo hasta la destrucción completa de la célula, manteniéndose los cuerpos apoptóticos fuertemente marcados por la lectina.

Finalmente, la última lectina que muestra afinidad por células germinales apoptóticas fue la LTA, con la que únicamente se observaron espermatoцитos paquitene con apariencia apoptótica. Estos fueron identificados por la tinción tanto de la membrana plasmática como del citoplasma, dando a la célula una apariencia homogénea. Se observó una condensación nuclear en el estadio temprano de apoptosis y, finalmente la desintegración nuclear de la célula apoptótica se acompañó por un elevado grado de compactación celular y una reducción de su tamaño. De hecho, fue posible identificar gran número de estados de apoptosis en la misma sección tubular. Este fenómeno pudo ser observado desde el grupo MR hasta el grupo TR.

Las lectinas WGA, UEA-I, MAA y SNA no mostraron ninguna afinidad por células germinales apoptóticas durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto.

Usando lectinas que marcan el acrosoma de espermátidas tardías (PNA, SBA, HPA y DBA) fue posible observar a dichas células muy próximas al núcleo de células de Sertoli o en posición muy basal en el epitelio seminífero en el grupo MR. Finalmente, PNA produjo una fuerte tinción del núcleo de algunas células de Sertoli en la región basal del epitelio tubular. Estas células tenían un núcleo aplanado y contraído y mostraron una morfología típica de células apoptóticas. Esta afinidad fue observada en los tres grupos de regresión testicular.

Objetivo 3: Dilucidar, con técnicas morfológicas específicas, durante la regresión del epitelio seminífero tras la exposición a un fotoperiodo corto, si existe pérdida de células de Sertoli por apoptosis y si se produce la fagocitosis de espermátidas elongadas por parte de las células de Sertoli (Artículo 3).

Diseño experimental

Confirmación de las células de Sertoli TUNEL +

Para confirmar la presencia de células de Sertoli TUNEL +, se realizaron dos técnicas de microscopía de luz: a) una inmunotinción y b) una tinción de doble fluorescencia.

a) Una inmunotinción para detectar filamentos de vimentina, componente del citoesqueleto exclusivo de células de Sertoli en el epitelio seminífero (Aumüller et al., 1988). Las secciones utilizadas fueron las mismas que para la histoquímica de TUNEL, que previamente habían sido escaneadas. Por esta razón, antes de realizar la técnica inmunohistoquímica, se procedió a desmontar las preparaciones sumergiendo los portaobjetos en xileno hasta que fuese posible despegar suavemente el cubreobjetos sin destruir el tejido. Después de quitar los cubreobjetos y el medio de montaje, las muestras fueron rehidratadas, aclaradas en PBS durante 15 minutos e incubadas con un anticuerpo frente a vimentina (Monoclonal mouse anti-vimentin clone V9, Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:50 en PBS/BSA al 1% durante 2 horas en cámara húmeda a 37°C. Después de aclarar en PBS, las muestras se incubaron en IgG Conejo anti-ratón biotinilado (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:200 en PBS/BSA al 1% durante 45 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. A continuación, después de 3 lavados en PBS, las muestras fueron incubadas con Estreptavidina-HRP (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:400 en PBS/BSA al 1% durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente y posteriormente reveladas con 0.05% diaminobenzidine (DAB) en 0.3% H₂O₂ durante 2 minutos. El contraste se realizó con rojo nuclear rápido durante 1 minuto. Finalmente las muestras fueron deshidratadas, aclaradas en xileno y montadas para su posterior observación. Como control negativo, una de las preparaciones fue procesada sustituyendo el anticuerpo primario por PBS. Las muestras fueron estudiadas con un microscopio de luz Olympus

BX-51 y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Olympus DP-25 conectada al microscopio.

b) Tinción con doble fluorescencia con el fin de realizar una segunda confirmación de las observaciones anteriores. Para esto, realizamos dos técnicas combinadas (histoquímica de TUNEL seguida de una inmunohistoquímica de Vimentina).

Todas las diluciones fueron realizadas en agua libre de DNasas. Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas siguiendo el protocolo para la técnica de TUNEL. A continuación se realizó un bloqueo con PBS/Glicina durante 20 minutos a temperatura ambiente seguido de una permeabilización con Cytonina (la proteinasa K no se recomienda para esta técnica) durante 1 hora a 37°C. Después de esto, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo contra vimentina (Monoclonal mouse anti-vimentin clone V9, Dako Denmark) a una dilución 1:50 en PBS/BSA al 1% durante 1 hora a 37°C seguido de tres lavados en H₂O libre de DNasas. En este punto, se continuó con el protocolo para la técnica de TUNEL parando antes del paso del revelado con Estreptavidina-HRP. A partir de este punto todos los pasos se realizaron en oscuridad. Las muestras fueron incubadas tanto con el anticuerpo Alexa Fluor® 488 IgG cabra anti-ratón (Molecular Probes, USA) a una dilución 1:400 para la vimentina como con una Estreptavidina conjugada con fluoresceína Alexa Fluor® 594 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a una dilución 1:1000 para TUNEL durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron lavadas en PBS 3 veces, montadas con un medio de montaje específico para fluorescencia (Dako, North America) y guardadas a 4°C en oscuridad toda la noche. Finalmente las muestras fueron estudiadas con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiophot) provisto de dos filtros de fluorescencia permitiendo observar la distribución de los filamentos de vimentina en verde y las células TUNEL+ en rojo y obtener imágenes al mismo tiempo. Las imágenes de ambos espectros fluorescentes fueron posteriormente unidas usando el software libre ImageJ.

Estudio semicuantitativo

Para determinar la actividad TUNEL+ de las células de Sertoli en los diferentes grupos de regresión testicular, se realizó un estudio semicuantitativo para obtener un índice de células de Sertoli TUNEL+. Para ello, utilizando las secciones de TUNEL

escaneadas, se cogieron 10 campos al azar de cada una de las dos secciones escaneadas. En cada campo, se contabilizaron tanto las células de Sertoli TUNEL+ como TUNEL- y se calculó el índice como (Células de Sertoli TUNEL+/número total de células de Sertoli) x 100. Después, utilizando las secciones teñidas con vimentina, se confirmó si todas las células TUNEL+ con morfología similar a células de Sertoli, realmente lo eran o no.

Con la intención de estudiar la actividad fagocítica de espermátidas elongadas por parte de las células de Sertoli, se realizó un conteo del número de espermátidas elongadas fagocitadas en relación a un número constante de 1600 células de Sertoli por grupo de regresión testicular. Para ello, se utilizó la técnica histoquímica para la lectina SBA contando únicamente aquellas espermátidas que se encontraban próximas o debajo del núcleo de las células de Sertoli.

Resultados

La técnica de tinción de rutina H&E reveló, especialmente en los grupos MR y SR, la existencia de células de Sertoli con una morfología considerablemente alterada a nivel del núcleo, donde se podía observar un pronunciado grado de aplanamiento acompañado por un incremento en la basofilia. Estas alteraciones también fueron evidentes en secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. La técnica de TUNEL identificó la presencia de algunas células, en la zona basal del epitelio seminífero como TUNEL+ con una morfología muy similar a las células de Sertoli, próximas a células germinales que también eran positivas. Para confirmar que esas células TUNEL + eran células de Sertoli, se realizó una inmunotinción para vimentina en la misma sección observándose que de hecho, eran células de Sertoli. Finalmente, la técnica de doble inmunofluorescencia para TUNEL y vimentina confirmó también la existencia de células de Sertoli que eran positivas tanto para vimentina como para TUNEL.

Usando MET fue posible identificar células de Sertoli en los grupos MR y SR que eran muy diferentes morfológicamente a las células normales. Así, se identificaron tanto células morfológicamente normales como células con alteraciones típicas de la regresión testicular. Junto a estas, se pudieron observar células con cambios ultraestructurales característicos de muerte celular. Los primeros cambios claros fueron el aplanamiento celular y el incremento de la electrodensidad del citoplasma. Asociado

con estos cambios en el citoplasma, se observaron estructuras vesiculares y degeneración mitocondrial junto con dilataciones en el aparato de Golgi. En estados intermedios de degeneración también fue frecuente la acumulación de componentes granulosos en el citoplasma, los cuales parecían representar numerosos grupos de ribosomas libres.

Los cambios en las prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli también fueron claramente visibles, las cuales pierden contacto con las células germinales adyacentes. En cuanto al núcleo de las células de Sertoli, se observaron tanto un arrugamiento como un incremento significativo en la electrodensidad de la cromatina comparados con el típico núcleo de este tipo de células.

En estados más avanzados de degeneración, una disminución sustancial en el tamaño de la célula de Sertoli se acompañó por un mayor grado de aplanamiento nuclear y un incremento de la acumulación de ribosomas, mientras que la dilatación en las cisternas del Golgi y de las mitocondrias se hizo más evidente. En los estados finales de degeneración, el núcleo mostró una fuerte electrodensidad y una pronunciada retracción del citoplasma en las que solo grandes estructuras vesiculares y dilataciones pudieron ser vistas. Este fenómeno fue evidente hasta la condensación y fragmentación total del núcleo en los estados finales de la muerte de las células de Sertoli.

En el estudio semicuantitativo del fenómeno de la muerte de células de Sertoli durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto, se observó que el índice de células de Sertoli TUNEL+ en los grupos MR (1.45 ± 0.33) y SR (0.95 ± 0.15) fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que en el grupo TR (0.30 ± 0.05). No se observaron diferencias significativas entre los grupos MR y SR.

En relación a la actividad fagocítica de las células de Sertoli en el epitelio seminífero, además de fagocitar restos apoptóticos de espermatogonias, espermatocitos espermátidas redondas, las células de Sertoli también fagocitaron espermátidas elongadas las cuales, como consecuencia, no fueron expulsadas a la luz tubular. Las primeras observaciones de este evento fueron hechas con microscopía de luz utilizando la tinción de H&E, cortes semifinos, la histoquímica de la lectina SBA y mediante la técnica de TUNEL, la cual identificó ocasionalmente espermátidas elongadas como TUNEL+. En todos los caso fue posible identificar espermátidas elongadas en zonas

próximas al núcleo de las células de Sertoli y en posición basal de las mismas. Dicha observación fue confirmada por MET.

MET también identificó cabezas de espermátidas elongadas dentro de vacuolas en la posición basal del epitelio seminífero e incluso porciones de espermátidas próximas al núcleo de las células de Sertoli. Estas células de Sertoli mostraron características ultraestructurales completamente normales con un núcleo bien desarrollado y un citoplasma normal, aunque se observaron gran cantidad de vacuolas lipídicas que generalmente son típicas de células en regresión. La fagocitosis de espermátidas elongadas fue evidente en los grupos MR y SR pero no en el grupo TR en el cual la espermatogénesis solo progresó como mucho hasta el estado de espermátidas redondas.

En el estudio semicuantitativo de la actividad fagocítica de espermátidas elongadas por parte de las células de Sertoli se observó una elevada actividad fagocítica en el grupo MR (14.03 ± 0.92). Esta actividad fue menor, aunque no significativa en el grupo SR (9.45 ± 1.81), mientras que en el grupo TR la actividad fagocítica fue significativamente menor (0.60 ± 0.33) ($P < 0.05$) que en los otros dos grupos de regresión.

4. CONCLUSIONES

1.- Durante la regresión testicular debida a la exposición a un fotoperiodo corto en el hámster sirio se produce, a nivel celular en el epitelio seminífero, un descenso inicial de la proliferación de las espermatogonias y un aumento de la apoptosis de células germinales. Al final de la regresión, hay una recuperación de la actividad proliferativa de espermatogonias mientras que la actividad apoptótica continúa afectando principalmente a los espermátocitos. A nivel histomorfométrico se producen dos fenómenos: por un lado, un descenso del diámetro y volumen tubular y por otro, un acortamiento del túbulo seminífero con un descenso del volumen intersticial. Estos fenómenos están íntimamente relacionados con lo ocurrido en el epitelio seminífero respecto a la proliferación y apoptosis de las células germinales (**Artículo 1**).

2.- Por primera vez en mamíferos, la utilización de la histoquímica de lectinas en secciones histológicas puede ser una herramienta muy útil para identificar espermátocitos y espermátidas apoptóticas siendo posible usar lectinas específicas para identificar estas células germinales. Además, la lectina PNA identifica células de Sertoli apoptóticas. Por ello, la aplicación de la histoquímica de lectinas en nuestro modelo de regresión del epitelio seminífero puede ser una herramienta apropiada para cuantificar el grado de apoptosis en relación al momento de la regresión, el tipo de célula afectada y el estadio en que se encuentra esa célula en apoptosis (**Artículo 2**).

3.- Hay evidencias morfológicas claras de muerte celular de naturaleza apoptótica de células de Sertoli durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto en el hámster sirio. Además, se observa que la capacidad fagocítica de la célula de Sertoli no solo se centra en restos apoptóticos de espermatogonias, espermátocitos y espermátidas redondas sino que también las espermátidas elongadas son fagocitadas durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto (**Artículo 3**).

1. GENERAL INTRODUCTION

In nature there are animal species which, during certain times of the year, lose their reproductive capacity. This phenomenon is known as seasonal breeding and is a strategy used to ensure greater reproductive success. Day length is one of the most important factors regulating seasonal breeding in these animals. Accordingly, we can distinguish between animals whose breeding season is in long days and others whose breeding season is in short days (Gerlach & Aurich, 2000). During the non-breeding season, a loss of fertility accompanied, in many cases, with a decrease in testicular weight and diameter of the seminiferous tubule has been observed (Lincoln GA, 1981). Several studies have identified different strategies for the arrest of spermatogenesis in these seasonally breeding animals during the non-breeding season. The first strategy is to reduce spermatogenesis while maintaining all germ cell lines, as in the ram (Hochereau-Reviers et al., 1985, 1992), red deer (Hochereau-Reviers & Lincoln, 1978), stallion (Berndtson et al., 1983) and mole rat (Gottreich et al., 1995). The second strategy is the arrest of spermatogenesis in spermatocytes and spermatids, it being possible to observe tubular sections where spermatogenesis reaches the state of round spermatids as maximum. This occurs in the roe deer (Schön et al., 2004), black bear (Tsubota et al., 1997), bank vole (Tähkä et al., 1997), prairie dog (Foreman D, 1997) squirrel (Barnes et al., 1986) and brown hare (Simeunovic et al., 2000). The third strategy involves the arrest of spermatogenesis in a state where the seminiferous tubules are only composed of spermatogonia and Sertoli cells, as occurs with the hairy armadillo (Luaces et al., 2013), mink (Pelletier RM, 1986; Blottner et al., 2006) and the yellowish myotis (Araujo et al., 2013). This third strategy also occurs in birds like ostrich (Madedkurozwa et al., 2002) or jungle crow (Islam et al., 2010). In the Syrian hamster (a rodent) testicular regression occurs during the short photoperiod and, histologically, this species can be included among those animals following the second strategy mentioned.

In order for spermatogenesis to occur properly, there must be a balance between spermatogonia proliferation and differentiation and the death of germ cells through apoptosis (De Kretser & Kerr, 1994; Blanco-Rodriguez & Martinez-Garcia, 1996; Loveland & Schlatt, 1997). Spermatogonia, which are diploid germ cells located in the zone closest to the basal membrane of the seminiferous tubule, arise from the division of spermatogonial stem cells (SSC). Like other stem cells, the SSC are defined by their ability to maintain the balance between self-renewal and differentiation into spermatogonia. This balance is essential to maintain the pool of SSC and respond to the

need for more spermatogonia to maintain the normal functioning of the testis (Phillip et al., 2010). Moreover, for spermatogenesis to take place correctly, the proper functioning of Sertoli cells is essential. These are somatic cells with a morphology that is normally polarized and columnar and whose functions are, among others, to serve as support for germ cells by supplying nutrients and acting as a mediator of the external signals required for the maintenance of spermatogenesis (Griswold MD, 1998). They also play an essential role in regulating the differentiation of these cells (Cheng & Mruk, 2002). Another of the essential functions of Sertoli cells in the seminiferous epithelium is to act as phagocytic cells to remove the debris of spermatids and apoptotic germ cells that appears during spermatogenesis (O'Donnell et al., 2011; Blanco-Rodriguez et al., 1999). Likewise, the phagocytosis of spermatids has been described in situations of seminiferous epithelium injury (Kerr et al., 1993). One feature that has always been considered characteristic of Sertoli cells is that they are a totally differentiated and quiescent cell type (Sharpe et al., 2003). Besides this, it is known that in various animal species, including human (Xia et al., 2012) and rat (Ramos & Dym, 1979), their number does not change in adults, but only varies during postnatal development (Berensztejn et al., 2002; Hayashi et al., 2002) when they reach a number that remains stable for the rest of their adult life. Even in pathological situations, which result in a deterioration of the seminiferous epithelium, Sertoli cell numbers remain constant despite suffering substantial cytoplasmic alterations (Nistal et al., 2001; Pinart et al., 2000).

The other phenomenon involved in maintaining the balance in spermatogenesis is apoptosis, which is a process of programmed cell death associated with morphological changes such as cell volume reduction, the condensation and marginalization of chromatin, and the formation of plasmatic membrane vesicles and of the so-called apoptotic bodies. Another feature associated with apoptosis is the rapid removal of dead cells by cells with a phagocytic capacity before the content of these dead cells is released causing an inflammatory reaction (Sinha-Hikim & Swerdloff, 1999). In many mammals such as rats (Hikim et al., 1995; Sinha-Hikim et al., 1997), hamster (Lue et al., 1997) and human (Hikim et al., 1998), the spontaneous death of germ cells through apoptosis has been observed during various stages of development. In rats and Syrian hamster, the spontaneous apoptosis of spermatogonia, particularly of type A, has been observed, and of spermatocytes during meiotic division. In the case of mouse, the

apoptosis of spermatocytes is common, less frequent in spermatogonia and very rare in spermatids (Sinha-Hikim & Swerdloff, 1999).

During the formation and maturation of sperm, changes in the pattern of glycoproteins have been observed in numerous species (Nicolson et al., 1977; Schwarz & Koehler, 1979). To study such glycoprotein patterns, lectins have been very widely used. These are proteins of microbial, vegetal (plant), fungal (yeast) and animal origin that specifically recognize sugar residues of glycoproteins and glycolipids, which show a characteristic binding pattern that defines the glycoconjugates of the organs or tissues being studied (Spicer SS, 1993). These proteins have been widely used in the characterization of specific carbohydrate patterns in various tissues and organs, including in the respiratory system (Castells et al., 1990; Shepherd et al., 1992, 1994; Kasper & Singh 1995), the digestive system (Pérez-Thomas et al., 1990; Madrid et al., 1997, 1998) and the male (Calvo et al., 1995, 2000; Pinart et al., 2001; Badia et al., 2005; Morales et al., 2005) and female (Aviles et al., 1994, 2000; Pastor et al., 2008) reproductive systems, or in various pathological conditions (Roth et al., 1996). Changes in these patterns can be studied under physiological or pathological conditions, not only in order to obtain biological information of these processes, but also as specific markers of them (Roth et al., 2011). For studies related to the seminiferous epithelium using lectin histochemical techniques, a pattern of differential affinity between different types of germ and somatic cells has been seen (Arya & Vanha-Perttula, 1984, 1986; Söderström et al., 1984; Kurohmaru et al., 1991, 1995, 1996; Jones et al., 1992; Martinez-Menarguez et al., 1992, 1993; Wine & Chapin, 1997; Calvo et al., 2000; Pinart et al., 2001). Studies about the pattern of glycoconjugates made in hamster testis in both the breeding season (Ballesta et al., 1991; Pastor et al., 2003) and in photo-inhibited animals show alterations in the expression and distribution of O and N-sugars both in the seminiferous tubule, particularly in the spermatogonia and spermatocytes, and in the testicular interstitium of fully regressed hamsters (Suda et al., 1998; Pastor et al., 2003).

Returning to the testicular regression that occurs in seasonal reproduction, it should be mentioned that there are animals where the main spermatogenesis regulation mechanisms are decreased proliferation (Blottner et al., 2007) or the desquamation of germ cell apoptosis and not their apoptosis (Dadhich et al., 2013). Also, increased

proliferative activity just before the breeding period has been semiquantitatively observed in the Iberian mole (Dadhich et al., 2010). Finally, from a quantitative point of view, only one study has been conducted (in the Djungarian hamster) about the change in the total number of spermatogonia in animals subjected to short photoperiod. In this study, a much smaller number of such cells compared to animals maintained in long photoperiod were observed still not known whether this decline is due to low proliferative activity or to the death of the same (Meachem et al., 2005).

The Syrian hamster, despite having a similar reproductive strategy as the brown hare (Strbenc et al., 2003), the roe deer (Blottner et al., 1995) and the Iberian mole (Dadhich et al., 2010), is an animal in which, due to the scarcity of studies, apoptosis, while important, is not considered to be the main mechanism that leads to testicular regression in the non-breeding season, (Dadhich et al., 2013). However, there are other animal species where germ cell apoptosis is considered the main mechanism by which testicular regression occurs. This phenomenon can affect germ cells in different ways since in the brown hare death by apoptosis occurs mainly in spermatocytes and rarely in spermatogonia (Strbenc et al., 2003). However, in the case of white-footed mouse, starling (Young & Nelson, 2001) and crow (Jenkins et al., 2007; Islam et al., 2012), apoptosis occurs, in spermatocytes, spermatids and, to a lesser degree, in spermatogonia. In the case of Syrian hamster it is only known that apoptosis in spermatocytes is essential for maintaining testicular regression once it has been established (Morales et al., 2002).

In addition, different patterns of testicular regression have been seen in the seminiferous epithelium of white-footed mouse and the starling because in starling, besides the death of germ cells, death by apoptosis in Sertoli cells also occurs, while in the white-footed mouse this phenomenon is not observed. This fact has led two models of testicular regression being proposed, according whether or not the Sertoli cells are affected (Young & Nelson, 2001). Sertoli cell death was also observed later in other birds like the crow (Jenkins et al., 2007; Islam et al., 2012), while in the Djungarian hamster, where a quantitative decline in the number of Sertoli cells in fully regressed animals is observed, there is no evidence concerning the mechanism through which the loss occurs (Meachem et al., 2005). This last study contrasts with that performed in Syrian hamster, where it was observed that the number of Sertoli cells does not varies in

fully regressed animals (Hikim-Sinha et al., 1988). All these studies that point to the loss of germ and Sertoli cells have used, among others, the TUNEL technique to identify apoptotic cells and transmission electron microscopy (TEM) to confirm the observations. In addition, in the study of apoptosis in both somatic and germ cells, lectin histochemical techniques have recently been used in fish, to identify the pattern of glycoconjugates in cells undergoing apoptosis (Liguoro et al., 2004). In the case of the seminiferous epithelium in the Syrian hamster, there have been no studies about the relationship between changes in the pattern of glycoconjugates, which occur at the plasma membrane level, and death through apoptosis of germ cell in fully regressed animals, and only the possibility that these changes could be related with death by apoptosis has been considered (Pastor et al., 2003).

From all the above we can conclude that: A) there is controversy concerning the role played by proliferation and apoptosis in testicular regression in the seminiferous epithelium during seasonal reproduction. More specifically, in the Syrian hamster it is considered that apoptosis plays a role in the maintenance of regression once established but it is not known whether or not it plays an important role during the same B) Although it is well known that the testis undergoes significant structural changes during the non-breeding season (testicular regression), especially due to short photoperiod, these changes have not been studied in detail at microscopic level throughout the process of regression. C) Lectin histochemistry is useful for histological and histopathological analysis of the seminiferous epithelium and is probably useful for identifying apoptotic cells in mammals, even though this technique has not been applied in mammals to detect apoptotic cells in histological sections. D) Finally, experimental data exist that point to a loss of Sertoli cells as well as germ cells during testicular regression in hamsters, although the mechanism behind the decreased numbers is unknown. Furthermore it is known the ability of these cells to phagocytose elongated spermatids in altered physiological conditions, not knowing whether this phenomenon occurs during testicular regression due to short photoperiod.

Consequently, in this thesis the above mentioned aspects have been addressed in three papers. In the **first article** both the proliferation/apoptosis dynamic (aspect A) and the histomorphometric changes that take place (aspect B) during testicular regression

are studied. The article shows how and in what way the histological structure of the testis is modified during regression and how proliferation and apoptosis are involved in the atrophy of the seminiferous epithelium during testicular regression due to short photoperiod in the Syrian hamster. A **second article**, which corresponds to aspect C, determines the usefulness of lectin histochemistry for identifying germ and somatic cells undergoing apoptosis, using as a model the seminiferous epithelium in testicular regression in the Syrian hamster subjected to short photoperiod. Finally, a **third article** discusses the issues related with aspect D, determining whether the loss of Sertoli cells during testicular regression due to short photoperiod reported in other species occurs in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) through apoptosis and whether there is, by Sertoli cell, phagocytosis of elongated spermatids during this process.

2. OBJECTIVES

The main objective of this thesis is to study the testicular regression due to short photoperiod in Syrian hamster both at a histomorphometrical level and in terms of the changes in cell proliferation and apoptosis that can occur during seminiferous epithelium atrophy in order to provide new information about the causes involved in this process of testicular regression. To do this, the following specific objectives are proposed:

1.-To perform a semiquantitative and quantitative study of both histomorphometric changes occurring during testicular regression due to short photoperiod and changes in proliferation and apoptosis in the germ cell during the atrophy of the seminiferous epithelium, determining the importance of these phenomena in the same **(Article 1)**.

2.- To assess, using an extensive battery of lectins, the ability to specifically detect “*in situ*” cells types of the seminiferous epithelium in apoptosis and the phase in which they are found during testicular regression due to short photoperiod in the Syrian hamster **(Article 2)**.

3.- To elucidate using specific morphological techniques during the regression of seminiferous epithelium after exposure to short photoperiod, whether Sertoli cell loss occurs by apoptosis and whether elongated spermatids are phagocytized by Sertoli cells **(Article 3)**

3. EXTENDED SUMMARY

3.1- MATERIAL AND METHODS

Animals and sampling

Fifty sexually mature 6-month-old male hamsters (*Mesocricetus auratus*) were maintained initially with a 14:10 h light-dark photoperiod. Five healthy and sexually mature 6-month-old male hamsters were used as Control group and maintained with the same 14:10 h light-dark photoperiod, while the other forty five animals were subjected to a short photoperiod of 8:16 h light-dark. All animals were kept in the animal facility of the University of Murcia at a room temperature of 20 °C and provided with food and water *ad libitum*. At 4, 6, 8, 10 and 12 weeks, nine treated animals plus one control were killed by overdose of CO₂ in a closed chamber and the testes were immediately removed. Part of the testis was fixed in Methacarn solution (Methanol, Chloroform and Acetic Acid 6:3:1) for 8 h at room temperature before being processed and embedded in paraffin. Sections of 5µm thickness were made using a Microm HM310 microtome (MICROM International GmbH, Walldorf, Germany). Some of these sections were used for several light microscopy techniques: hematoxylin-eosin (H&E) for the semiquantitative and morphometric studies; the immunohistochemical technique of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) for the semiquantitative and quantitative studies of cell proliferation; the histochemical techniques of TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP *in situ* nick end labelling) for semiquantitative and quantitative cellular studies of death cell by apoptosis; and the lectin histochemistry technique for the pattern recognition of glycoconjugates in germ and somatic cells of apoptotic appearance. The other part of the testis was used for an ultrastructural study by Transmission Electron Microscopy (TEM). Three regression groups were established: mild regression (MR), strong regression (SR) and total regression (TR). These groups were established not only according to the time of exposure to a short photoperiod and the testicular weight but also to other histological parameters that have been studied in the present doctoral thesis.

Biomedical ethics

This study was performed according to the ethical and legal standards mentioned in both Spanish Royal Decree RDL 1201/2005 of 10th October and Spanish Royal Decree RDL 53/2013 of 10th October concerning the protection of animals used for experimentation and other scientific purposes, and 2010/63/EU legislation on animal protection.

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunohistochemistry assay

The samples were deparaffinized with xylene, rehydrated in ethanol (100, 96 and 70%) and distilled water. The peroxidase activity was quenched with 0.3% H₂O₂ (PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature during 30 minutes. Then, the samples were incubated in a humidity chamber with 1.5% normal rabbit serum (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, UK) in PBS for 1 hour. The samples were then incubated with the PCNA antibody (Biomeda, Foster City, CA; USA) diluted 1:200 in PBS containing 1% of Bovine Serum Albumin ((BSA) from Sigma-Aldrich Co St. Louis, Montana, USA) overnight at 4 °C. The following day, samples were washed with PBS three times and incubated with biotilylated Polyclonal Rabbit anti-mouse immunoglobulin (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:200 in PBS/BSA for 45 minutes. After washing with PBS three times, samples were incubated with Streptavidin conjugated with HRP (Horseradish Peroxidase) (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:300 in PBS/BSA for 30 minutes. After the incubation, samples were washed in PBS three times and for the visualization of peroxidase activity, the sections were incubated in a substrate–chromogen solution containing 3,3′ diaminobenzidine (DAB (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA)) and 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) until a brown colour appeared and washed twice with distilled water. Counterstaining was carried out using Mayer’s haematoxylin stain for 5 seconds. Finally, samples were dehydrated with a gradually increasing concentration of ethanol (70, 96 and 100%), washed three times in xylene and mounted with DPX (Prolabo®, Hermosilla, Sonora, Mexico). The samples were studied with an Olympus BX-51 light microscope and photographs were taken with an Olympus DP-25 (Olympus, Tokio, Japan) digital camera connected to the microscope.

TUNEL labelling assay

Germ cell apoptosis was examined according to the protocol of the “TACS TdT in situ Apoptosis Detection kit” (TUNEL reaction, R&D Systems, Minneapolis, USA). The samples were deparaffinized in o-xylene, rehydrated in ethanol (100, 90 and 70%), and washed with DNase-free water. Then, the samples were incubated with proteinase K (1 mg/ml) for 20 minutes. The peroxidase activity was quenched with 0.3% H₂O₂ in methanol for 30 minutes. Once the samples were washed in DNase-free water for 1 minutes two times they were immersed in 1X TdT labelling buffer (1M TACS Safe-TdT Buffer, 0.5 mg/ml BSA, 0.6 mM 2-mercaptoethanesulfonic acid) at room temperature for 5 minutes and incubated for one hour at 37 °C with TdT dNTP Mix (0.25 mM biotinylated dNTP), 50x Mn⁺²(1µl), TdT Enzyme (1µl) and 1X TdT labelling buffer. The reaction was stopped with TdT stop buffer (0.1 M EDTA, pH 8.0). Subsequently, the samples were washed in PBS and incubated with streptavidin-HRP for 10 minutes at room temperature. After washing in PBS, the samples were stained with TACS Blue Label and counterstained with Contrast C solution (Nuclear Fast Red). Negative control sections, processed without TdT, did not show positive labelling. Finally, samples were studied with an Olympus BX-51 light microscope and photographs were taken with an Olympus DP-25 digital camera connected to the microscope.

Lectin histochemistry

Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through a series of decreasing ethanol concentrations (100, 90 and 70%). In the case of HRP-conjugated lectins, the samples, after a brief rinse for 5 min in TBS (Tris buffered saline, pH 7.4), were incubated in a solution containing 0.3% H₂O₂ to block endogenous peroxidase activity. After 3 rinses in TBS, sections were incubated with lectins (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA) at the appropriate dilution (Table 1) in a moisture chamber at room temperature for 1.5 h. After washing in TBS, sections were immersed in TBS containing 0.05% DAB (Sigma, St. Louis MO, USA) and 0.3% H₂O₂ to demonstrate peroxidase-containing sites. Sections were then counterstained with Harris' haematoxylin, dehydrated, cleared and mounted in DPX.

For DIG-conjugated lectins, sections were blocked with 0.3% H₂O₂ and incubated with 1% BSA in TBS for 10 min. DIG-conjugated lectins were applied at the appropriate dilution (Table 1) in a solution consisting of 1% BSA, 0.05% Tween 20, and 0.05% Triton X-100 in TBS for 1.5 h at room temperature. After rinsing in TBS, samples were incubated with an HRP-labelled anti-DIG antibody for 1 h, and diluted at 0.6 U/ml in TBS. After washing in TBS, sections were immersed in TBS containing 0.05% DAB (Sigma, St. Louis MO, USA.) and 0.3% H₂O₂ to demonstrate peroxidase-containing sites. Sections were counterstained with Harris' haematoxylin, dehydrated, and mounted in DPX. Finally, samples were studied with an Olympus BX-51 light microscope and photographs were taken with an Olympus DP-25 digital camera connected to the microscope.

Transmission electron microscopy (TEM) study

Samples (1 mm³) were fixed for 4 h in 3.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. They were then washed in 0.855 mg/100ml saccharose-cacodylate, postfixed in 1% osmium tetroxide (for 2h), dehydrated in a graded acetone series and embedded in Epon 812 (Serva, Heidelberg, Germany). Semi-thin sections (1-µm-thick) were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were cut using a Reichert-Imy Ultracut ultramicrotome (Leyca Microsystems, Wetzlar, Germany) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The ultrastructural study was performed with a Jeol-1011 (Jeol, Tokyo, Japan) electron microscope.

Histological characterization of tubular sections according to the degree of degeneration for qualitative and semiquantitative studies

For the semiquantitative study of the degree of tubular degeneration, two 5 µm-thick sections of each testis, chosen randomly, were used and 50 tubular cross-sections were examined from each section using the Motic Images Plus 2.0 image analysis program. The tubular sections were classified according to the degree of tubular degeneration into 4 categories: a) Normal, when the tubular epithelium contained the entire series of well-differentiated germ cells (spermatogonia, spermatocytes, spermatids); b) hypospermatogenic, when a reduction in late spermatid development with occasional desquamation of germ cells in the lumen of the seminiferous tubule and a thinning of the germinal epithelium was observed; c) round spermatid arrest, when the

germinal epithelium developed until, but not beyond, the appearance of round spermatids (no late or elongated spermatids) in the lumen of the seminiferous tubule; d) spermatocyte arrest, when the germinal epithelium developed only until spermatocytes were observed and no (or few) round spermatids could be observed. The above classification of tubular section types was used in the different studies made in the present doctoral thesis.

Statistical analysis

For some statistical studies, the data were logarithmically transformed. A one way analysis of variance was conducted followed by a *post hoc* test contrasting equality between pairs of means, using the least significance difference (LSD) test and Bonferroni's method. The results were considered statistically significant when the P-value was less than 0.05. The results are presented as average $\pm$ standard error of the mean in the text, figures and tables. The SPSS 19 statistical software package (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) was used.

3.2-. EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS

Objective 1: To perform a semiquantitative and quantitative study of both histomorphometric changes occurring during testicular regression due to short photoperiod and changes in proliferation and apoptosis in the germ cell during the atrophy of the seminiferous epithelium, determining the importance of these phenomena in the same (Article 1).

Experimental design

Qualitative and quantitative histological studies and determination of the regression groups

The testicular regression groups were established according to the time of exposure to short photoperiod (MR: 4 weeks; SR: 6-8 weeks; TR: 12 weeks) and also to the proportion of tubular sections (Control: 0%; MR: 3.9%; SR: 42.9%; TR: 81.6%) in spermatid arrest, tubular diameter (Control: $285.3 \pm 4.3 \mu\text{m}$; MR: $234.3 \pm 8.6 \mu\text{m}$; SR: $163.7 \pm 6.4 \mu\text{m}$; TR: $128.9 \pm 5.6 \mu\text{m}$) and tubular seminiferous epithelium area (Control: $55039.9 \pm 11254.5 \mu\text{m}^2$; MR: $34852.2 \pm 7353.9 \mu\text{m}^2$; SR: $17426.76 \pm 4830.84 \mu\text{m}^2$; TR: $10480.7 \pm 2722.2 \mu\text{m}^2$).

To obtain the proportions of the tubular sections, a semiquantitative study of the degree of tubular degeneration was performed following the above criteria. For this, two randomly chosen $5 \mu\text{m}$ thick sections of each testis were used and 50 cross-sectioned tubules from each section were examined. By classifying each tubule according to their degree of degeneration, the proportions of tubular sections of each animal studied were obtained.

The mean tubular section epithelial area (**MTSEA**), the mean tubular diameter (**MTD**) and the mean lumen diameter (**MLD**) were calculated using four random $5 \mu\text{m}$ -thick sections of each testis (observed with a 10x objective). From each section, 25 tubule cross-sections were measured (100 tubule cross-sections per animal). MTSEA was determined automatically by drawing the tubular perimeter. MTD was determined by taking the average of two measurements made in the form of a cross for each tubular section. **MLD** was determined by drawing the luminal perimeter of each tubular cross

section. To study the semiquantitative parameters, the Motic Images Plus 2.0 (Motic, Wetzlar, Germany) image analysis software was used.

Quantitative histomorphometric study

The testes were weighed immediately after removal using a Mettler PS 360 balance (Mettler-Toledo, L'Hospitalet de Llobregat, Spain). The testicular volumes (V_T) were estimated by considering a testis density (ρ) of 1.037g/cm³ (Hikim et al., 1988) and the testis weight (T_W) ($V_T = \rho / T_W$).

For the histomorphometric study, four 5 μ m-thick sections stained with haematoxylin-eosin were used. Subsequently, 30 random fields were chosen and the following variables were calculated using the Micron Leica Qwin (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) image analysis software: (1) the volume density of the seminiferous tubules (VD_{ST}), calculated as the seminiferous tubule surface/reference area (798266.63 μ m²) ratio; (2) the testicular interstitium volume density (VD_{TI}), as the ratio of interstitium surface/reference area (798266.63 μ m²) ratio; (3) the total volume of seminiferous tubule per testis (V_{ST}) multiplying $VD_{ST} \times V_T$; (4) the length of seminiferous tubule per volume unit (L_v) using the established formula: $L_v = VD_{ST} / \pi R^2$ (Wing & Christensen, 1982; Santamaria et al., 1995). In addition, for the total length of the seminiferous tubules (L_{ST}) value, all tubules were assumed to form a single cylinder with a length L, a radius R (MTD/2) and a volume V_{ST} . Then, L_{ST} was calculated as $L_v \times V_T$; (5) the total tubular area (**TTA**), as $2\pi R \times L_{ST}$; (6) the total volume of the seminiferous epithelium (V_{SE}) as $MTSEA \times L_{ST}$; (7) the volume of testicular interstitium (V_{TI}) as $VD_{TI} \times V_T$; and (8) the volume of the tubular lumen (V_{TL}) as $MLD \times L_{ST}$.

Semiquantitative evaluation of the immunohistochemical study

For the cell proliferation study above described PCNA immunohistochemistry technique was used. This technique reveals the cells found in G1/S and G2 phases of the cell cycle. In the seminiferous epithelium, it is known that the only proliferating germ cells are spermatogonia, so the only positive cells recorded were this cell type. To count PCNA + spermatogonia, 4 random sections were used, selecting 25 random fields of each (field size = 0.0273mm²). The images of the fields were taken on an Olympus BX-51 light microscope using a 40x objective. Proliferative activity was determined by

counting the number of positive spermatogonia $\times 100/\text{total spermatogonia}$ (positive plus negative) to yield the spermatogonia proliferation index (PI).

Semiquantitative evaluation of apoptotic activity using the histochemical TUNEL technique

The apoptotic activity of the seminiferous epithelium in the Syrian hamster subjected to short photoperiod was assessed using the TUNEL histochemistry technique. To count the different germ cell types in apoptosis, 4 random sections of each animal were used. Then, 25 random fields of each section (field size = 0.0273mm^2) were selected and the number of TUNEL + spermatogonia, spermatocytes and round spermatids and total germ cells were counted *in situ*. To identify each cell type, both the shape of the cell and its relative position in the seminiferous tubule were taken into account. With these values it was possible to calculate the apoptotic index (AI) of each cell type as the number of TUNEL + germ cell types $\times 100/\text{number of total germ cell type}$ (positive and negative). In this way, the AI of spermatogonia, spermatocytes and round spermatids were calculated.

After obtaining PI and AI, we proceeded to study the relationship between both during testicular regression due to short photoperiod. The following relationships were studied: spermatogonia AI / spermatogonia PI; spermatocytes + spermatogonia AI / spermatogonia PI; round spermatids + spermatocytes + spermatogonia AI / spermatogonia PI.

Quantitative study of proliferative and apoptotic activities

For the quantitative study, the volume density of germ cells (V_d) was calculated using the Floderus equation (Floderus S, 1944; Morales et al., 2003), where $N_v = N_a/(D + t - 2h)$. **N_a** is the number of nuclei per unit area of testis (mm^2) (data obtained from the semiquantitative apoptotic study), **D** is the mean diameter of each germ cell nucleus, taken as the mean value of 50 cell nuclei of each germ cell type, **t** is the section thickness ($5\mu\text{m}$) and **h** is $D \times 0.1$.

The number of the total proliferating spermatogonia and total apoptotic and non-apoptotic spermatogonia, spermatocytes and round spermatids during testicular regression due to short photoperiod were obtained by multiplying **V_d** (obtained with the

Floderus equation) $\times V_t$. For the total proliferating spermatogonia, **Na** (from the Floderus equation) was obtained from the semiquantitative proliferative study.

Results

Histomorphometric study of testicular regression

Qualitative and semiquantitative histological study

The seminiferous tubule histology of the groups established differed with regard to the type of tubular section (different degrees of epithelial degeneration). Thus, in the testes of the Control group (animals not subjected to a short photoperiod), normal tubular sections, with complete spermatogenesis and some hypospermatogenic sections showing a wider lumen, were predominantly observed. In the MR group, hypospermatogenic tubular sections prevailed, accompanied by tubular sections in round spermatid and spermatocyte arrest. In the SR group, normal tubular sections disappeared, and a low proportion of hypospermatogenic tubular sections were observed. This was accompanied by an increase in tubular sections in spermatocyte and round spermatid arrest. Finally, the TR group was characterized by the presence of tubular sections in spermatocyte arrest and, in some cases, round spermatid arrest. Semiquantitatively in these groups there was a significant decrease ($P < 0.05$) in the percentage of normal tubular sections between the Control group (76%) and the MR (26.45%) and SR (3.13%) groups. By contrast, the hypospermatogenic tubular sections showed a significant increase ($P < 0.05$) between the Control group (24%) and the MR group (61.36%) but decreased significantly ($P < 0.05$) in the SR group (6.13%). The hypospermatogenic tubular sections were replaced by tubular sections in round spermatids arrest as observed from the significant increase ($P < 0.05$) of these tubular types from MR group (12%) to SR (47.63%) group, before decreasing in the TR group (18.4%). Finally, the tubular sections in round spermatids arrest were replaced by spermatocytes arrest being observed the appearance of this tubular type already in the MR group (0.18%) and a significant increase ($P < 0.05$) in the SR group (43.13%), becoming majority in the TR group (81.6%).

The mean tubular diameter (MTD) and the mean tubular cross-sectional epithelium area (MTSEA) showed were significantly ($P < 0.05$) lower in the MR, SR and TR groups

than in the Control group. In addition the mean luminal diameter (MLD) was ($P<0.05$) lower in the SR and TR groups.

Quantitative histomorphometric study

As regards testicular weight, a significant decrease ($P<0.05$) in all three regression groups, MR, SR and TR compared with the Control group was observed. In addition, a significant decrease ($P<0.05$) in V_T , V_{SE} , V_{ST} and TTA in the three regression groups compared with the Control was observed. V_{TI} and V_{TL} showed a significant decrease ($P<0.05$) in SR and TR, while L_{ST} only suffered a significant decline ($P<0.05$) in the SR group, remaining constant in the TR group. A summary of the changes occurring in the testis during testicular regression is provided in Figure 1.

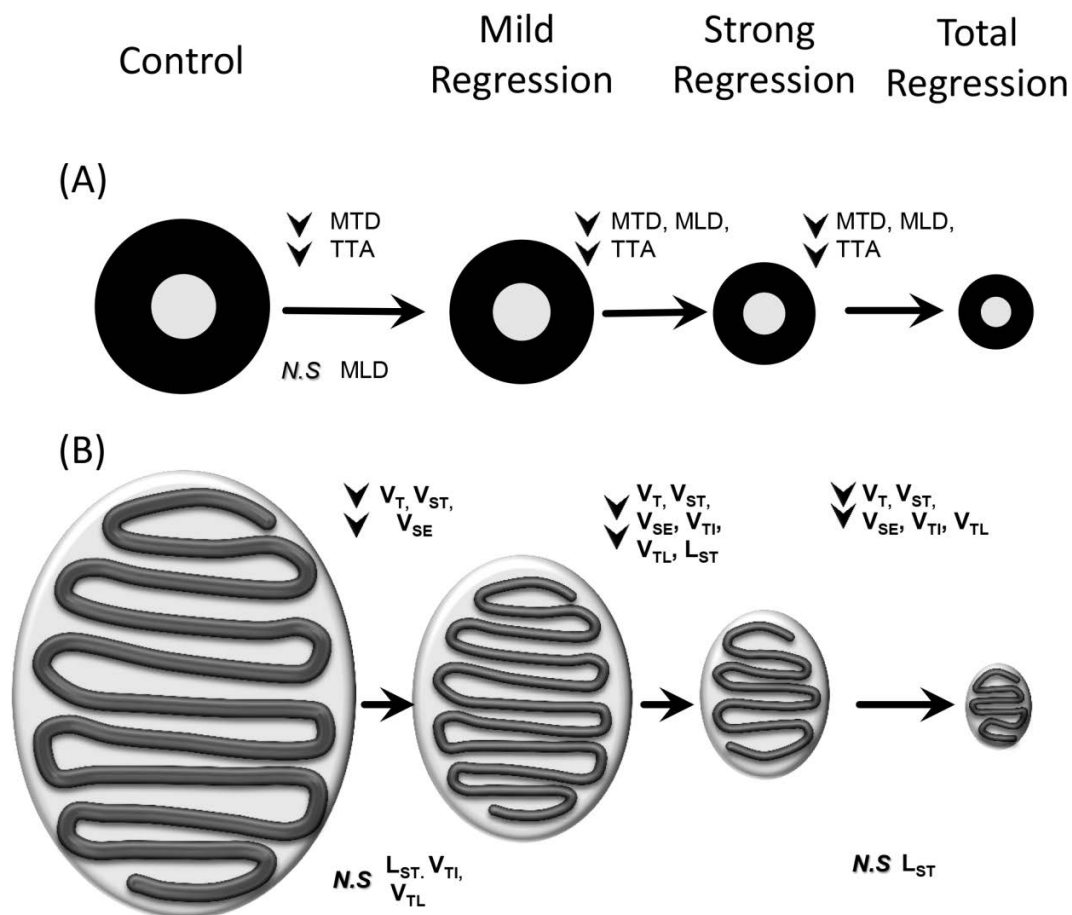


Figure 1. Scheme of morphometric changes taking place in the Syrian hamster testis during testicular regression due to short photoperiod. **A)** Scale representation of a cross section of a seminiferous tubule where the seminiferous epithelium (black) and the tubular lumen (gray) are shown. **B)** Scale schematic representation of a testicular longitudinal section showing the variations sustained in the regression groups in both the seminiferous tubules and testicular interstitium.

N.S: No statistical significance. **MTD:** Mean Tubular Diameter. **MLD:** Mean Lumen Diameter. **TTA:** Total Tubular Area. V_T : Testicular Volume. V_{ST} : Volume of Seminiferous Tubule. V_{SE} : Volume of Seminiferous Epithelium. V_{TI} : Volume of Testicular Interstitium, V_{TL} : Volume of Tubular Lumen L_{ST} : Length of Seminiferous Tubule

Proliferation and apoptosis during testicular regression in the seminiferous epithelium due to short photoperiod

Semiquantitative study of proliferation and apoptosis

Proliferating spermatogonia were identified by PCNA, which differentiated between PCNA+ spermatogonia, with a brown nuclear staining, and PCNA- spermatogonia, with a blue nucleus typical of counterstaining with haematoxylin. No proliferating Sertoli cells were observed with this technique. Furthermore, the TUNEL technique allowed identification of apoptotic germ cells due to the intense black coloration that positive cells acquired. Also TUNEL + Sertoli cells were observed. Thus, according to their size and relative position in the seminiferous epithelium, it was possible to identify the different types of germ cell undergoing apoptosis.

The proliferation index (PI) of the spermatogonia was significantly lower ($P<0.05$) in the MR group than in the Control group, recovering gradually from the SR group to the TR group, where it reached similar values to those of the Control group.

As regard the death by apoptosis of the cells from the germinal epithelium in the Syrian hamster testis during testicular regression due to short photoperiod, the apoptotic index (AI) values of round spermatids and spermatocytes were significantly higher ($P<0.05$) in the SR and TR groups than in the Control group. In contrast, the AI of spermatogonia was significantly higher ($P<0.05$) in the MR group, remaining constant in SR and returning to similar values to the Control group in the TR group. When the apoptotic activity of spermatogonia + spermatocytes was studied, a significant increase ($P<0.05$) from the MR group to the TR group was observed. Finally, when the apoptotic index of the germ cells as a whole was examined, the greatest increase in apoptotic activity was observed in the SR group. The level of activity remained constant in the TR group.

With the proliferation and apoptosis results obtained above, the relationship between the two phenomena was studied during testicular regression. Thus, it was observed that the spermatogonia AI / spermatogonia PI ratio was significantly higher ($P<0.05$) in the MR and SR groups than in the Control group, returning to normal values in the TR group. Regarding the spermatogonia + spermatocytes AI / spermatogonia PI relationship, a significant increase ($P<0.05$) was observed during the process of testicular regression. The spermatogonia + spermatocytes + round spermatids AI / spermatogonia PI ratio was significantly higher ($P<0.05$) in the MR and SR groups compared with the Control group decreasing in the TR group to the levels observed in the MR group.

Quantitative study of proliferative and apoptotic activity

The total number of spermatogonia that were seen to be proliferating during testicular regression due to short photoperiod was significantly lower ($P<0.05$) in the MR and SR groups than in the Control group, while the decrease was not significant between SR and TR groups. With regard to apoptosis during testicular regression due to short photoperiod a significant increase ($P<0.05$) in the number of apoptotic round spermatids in the MR and SR groups compared to the Control group was observed, accompanied by a significant decrease ($P<0.05$) in the TR group.

With regard to apoptotic spermatocytes, their number was significantly higher ($P<0.05$) in the MR and SR groups than in the Control but similar to the Control group in the TR group. In the case of apoptotic spermatogonia, there was a significant increase ($P<0.05$) in the MR group (compared with the Control), but was similar in the SR group and significantly lower ($P<0.05$) in the TR group. Overall, there was a significant increase ($P<0.05$) in the number of apoptotic germ cells in the MR and SR groups, but the TR group showed similar values to the Control group.

The total number of spermatogonia per testis during testicular regression due to short photoperiod was significantly lower ($P<0.05$) in the MR and SR groups with respect the Control group. The total number of round spermatids and spermatocytes per testis was significantly lower ($P<0.05$) in all groups than in the Control group. Finally, the total number of germ cells studied was significantly lower ($P<0.05$) in all the groups compared to the Control.

TEM study

Apoptosis of the different germ cell types during testicular regression due to short photoperiod observed with light microscopy as TUNEL + cells was confirmed by TEM. Thus, spermatogonia located in basal position and close to their adjacent cells initially suffered a loss of adhesion to neighbouring cells, in addition to condensation of the chromatin at the nuclear periphery, while the cytoplasmic organelles were not much altered. Finally, total degradation of the nucleus, accompanied by total cytoplasmic degeneration, was observed.

Spermatocytes, especially in the leptotene-pachytene stage, just as the spermatogonia, were initially separated from adjacent cells, while the chromatin within the nucleus condensed. However, this nuclear condensation was accompanied by degeneration and cytoplasmic vacuolization, eventually leading to total cell vacuolization prior to destruction.

Finally, the round spermatids in Golgi or cap stages initially underwent nuclear condensation, especially in the centre of the nucleus as well as generalized cytoplasmic degeneration. In the final stages of apoptosis, the cell shrinkage that occurred was accompanied by the total deformation of the nucleus and total chromatin condensation along with cytoplasmic vacuolization. Apoptotic cell debris was found in Sertoli cells in all studied groups.

Objective 2: To assess, using an extensive battery of lectins, the ability to specifically detect “*in situ*” cells types of the seminiferous epithelium in apoptosis and the phase in which they are found during testicular regression due to short photoperiod in the Syrian hamster (Article 2).

Experimental design

To perform the following experiment the testicular regression groups previously established were taken into account. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated lectins (PNA, SBA, HPA, LTA, Con-A, UEA-I, WGA, DBA), 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from SIGMA (St. Louis MO, USA). Digoxigenin (DIG)-labeled lectins (MAA, GNA, AAA, SNA) and anti-DIG antibody were obtained from Boehringer (Barcelona, Spain). The common names, sugar specificity, and concentrations of lectins are shown in Table 1.

Table 1: Concentration, specificity and inhibitory sugars of lectins used in the present study.

Taxonomic name	Acronym	Concentration	Specificity	Inhibitory sugar
<i>Galanthus nivalis</i>	GNA	10 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Man α 1,3-Man-	Methyl - α -Man
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con-A	20 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -D-Man > α -D-Glc	Methyl- α -Man
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	20 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -D-GalNAc	NAc D-Gal NAc (0.4 M)
<i>Glycine max</i>	SBA	12 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -D-GalNAc > β -D-Gal	NAc D-Gal NAc
<i>Helix pomatia</i>	HPA	12 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -D-Ga NAc α 1,3-Gal	NAc D-Gal NAc
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	6 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Gal β 1,4-GlcNAc β 1 > GlcNAc β 1 > Neu5Ac	D-Glc NAc (0.7 M)
<i>Arachis hypogea</i>	PNA	12 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Gal β 1,3-GalNAc α 1	β -D-Gal (0.4 M)
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	25 $\mu\text{m ml}^{-1}$	L- Fuc α 1,2-Gal β 1,4-GlcNAc β 1-	L-Fuc
<i>Aleuria aurantia</i>	AAA	15 $\mu\text{m ml}^{-1}$	L-Fuc α 1-6-	L-Fuc
<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA	25 $\mu\text{m ml}^{-1}$	α -L-Fuc	L-Fuc
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	15 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Neu5Ac α 2,3-Gal β 1,4-Glc NAc β 1	Neuraminic acid lactose
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	15 $\mu\text{m ml}^{-1}$	Neu5Ac α 2,6-Gal/Gal NAc	Neuraminic acid lactose

To assess the specificity of the lectin staining, the following controls were used: (1) preabsorption of the lectins with their corresponding inhibitory sugar at a concentration of 0.2 M (except for those using a different concentration, as specified in Table 1); and (2) substitution of conjugated lectin by TBS to determine the presence of endogenous peroxidase activity.

For the qualitative study of the expression pattern of lectins, 4 random testicular sections from each animal were used. From each section, 25 random fields were selected and the images were captured with an Olympus DP-25 digital camera connected to a light microscope Olympus BX-51.

Results

The examined lectins, PNA, GNA, AAA, Con-A, HPA and LTA, showed strong positivity in the seminiferous epithelium cells that had the morphological characteristics of cells undergoing a process of apoptosis: nuclear condensation, nuclear fragmentation or separation between neighbouring cells.

Using PNA, in addition to the normal pattern of expression of glycoconjugates in the testicular epithelium, we observed tubular sections in spermatid arrest in the MR group. These sections showed pachytene spermatocytes with a moderately labelled cytoplasm and a greater degree of nuclear chromatin condensation compared with the normal spermatocytes in the same group. In these spermatid arrest tubular sections, increased chromatin compaction and a strong affinity for PNA allowed spermatocytes in the early stages of apoptosis and in different stages of development to be identified. Furthermore, secondary spermatocytes showed a strongly labelled cytoplasm with this lectin. In the SR group, this phenomenon became more evident, with an increase in apoptotic spermatocytes, and continued to be observed in fully regressed animals. In this group particularly, it was significant that, in tubular sections in spermatid arrest, early spermatids showed a strongly positive cytoplasm compared with the Control group. PNA also identified spermatids with deformed acrosomes in both the MR and SR groups, accompanied by increased positivity in the cell cytoplasm undergoing apoptosis. This fact was more apparent in the SR group and continued to be observed in TR group, despite the scarce presence of this cell type.

As regards GNA, it was observed that positivity was very high in spermatocytes of the MR group but only in very advanced stages of apoptosis compared with the Control group. This positivity was particularly evident at cell cytoplasm level. In addition, a high degree of compaction could be observed, especially in the preleptotene spermatocyte nucleus. In more advanced stages of apoptosis, this positivity was more evident in spermatocytes, an observation that was still evident in the SR and TR groups. The fact that the GNA is not a strong marker of round spermatids in the Control group helped to identify them when they began to degenerate because they exhibited strong staining in both the cytoplasm and the plasmatic membrane, confirming their entry into apoptosis. This positivity was more intense in the SR group and remained in the TR group.

Another lectin which was able to label apoptotic germ cells was AAA. Labelling with this lectin in the Control group was weak in the cytoplasm of spermatocytes and spermatids. Because of this, it was possible to identify pachytene spermatocytes from the early stages of apoptosis because the affinity of the lectin in the cytoplasm of apoptotic cells was more intense, making it possible to observe different stages of apoptosis in the same tubular section. It was also possible to identify apoptotic zygotene spermatocytes with a strongly stained cytoplasm. This phenomenon was observed in the seminiferous epithelium of all the groups. Furthermore, we observed that AAA only marked early round spermatids in an advanced state of apoptosis and apoptotic bodies derived from them. This phenomenon was only detectable in the SR and TR groups, while in the MR group this staining change was not observed or was very weak.

HPA, a lectin which stained spermatocytes very weakly, but slightly more strongly late spermatids and spermatozoa in the controls, produced strong staining in the plasma membrane and the cytoplasm of spermatocytes, both in pachytene and zygotene, during the early stages of apoptosis. With this lectin, it was also possible to identify early spermatids, barely marked in the controls, which acquired strong cytoplasmic staining when undergoing apoptosis, accompanied, in some instances, by the appearance of acrosomal deformations. This phenomenon became more evident in the SR group.

Con-A stained spermatocytes in the cytoplasm more strongly in the MR group than in the Control group. This staining was evident even in moderately advanced stages of apoptosis, when chromatin was more condensed compared with normal spermatocytes. This strong cytoplasmic labelling continued until more advanced stages of apoptosis, when the chromatin became highly condensed. Furthermore, this phenomenon was repeated throughout the testicular regression process until total regression. On the other hand, round spermatids, whose labelling with Con-A in the controls was quite weak, became strongly positive in the initial stages of apoptosis but only in the SR group. This strong labelling was maintained until the complete destruction of the cell, the apoptotic bodies continuing to be strongly marked by the lectin.

Finally, the last lectin studied for its possible affinity for apoptotic germ cells was LTA, with which only pachytene spermatocytes of apoptotic appearance were observed. These were identified by the staining of both the plasmatic membrane and the cytoplasm, giving a homogeneous appearance. Condensation was observed in the early

stages of apoptosis and, finally, the general nuclear disintegration of the apoptotic cell was accompanied by a high degree of cell compaction and a reduction in cell size. In fact, it was possible to identify numerous stages of apoptosis in the same tubular section. This phenomenon could be observed from MR to TR.

WGA, UEA-I, MAA and SNA lectins did not show any affinity for germ apoptotic cells during testicular regression due to short photoperiod.

Using lectins which mark the acrosome of late spermatids (PNA, SBA, HPA and DBA), it was possible to observe them very close to the nucleus of Sertoli cells or in very basal positions in the epithelium in the MR group. Finally, PNA led to strong staining of the nuclei of some Sertoli cells in the basal region of the tubular epithelium. These cells had a flattened and contracted nucleus and showed a typical morphology of apoptotic cells. This affinity was observed in all three groups of testicular regression.

Objective 3: To elucidate using specific morphological techniques during the regression of seminiferous epithelium after exposure to short photoperiod, whether Sertoli cell loss occurs by apoptosis and whether elongated spermatids are phagocytized by Sertoli cells (Article 3).

Experimental design

Confirming the observation of TUNEL+ Sertoli cells

To confirm the presence of TUNEL Sertoli cells, two light microscopy techniques were applied: a) immunostaining and b) double-fluorescence staining.

a) Immunostaining for light microscopy was used to detect vimentin filaments, structural component of the cytoskeleton exclusive to the Sertoli cells in the seminiferous epithelium (Aumüller et al., 1988). The sections used were the same as those obtained for TUNEL histochemistry and previously scanned. For that reason, before performing the immunohistochemical technique, we proceeded to immerse the slide in xylene until it was possible to take off the coverslips gently and not destroy the tissue. After removing the coverslips and the mounting medium, the samples were rehydrated, washed in PBS for 15 minutes and incubated with an antibody against vimentin (Monoclonal mouse anti-vimentin clone V9, Dako, Glostrup, Denmark) at 1:50 dilution in 1% PBS/BSA for 2h in a moisture chamber at 37°C. After rinsing in PBS, the samples were incubated with Biotinylated Rabbit Anti-Mouse IgG (Dako, Glostrup, Denmark) at 1:200 dilution in 1% BSA/PBS for 45 minutes in a moisture chamber at room temperature followed by 3 rinses in PBS. Then the samples were incubated with Streptavidin-HRP (Dako, Glostrup, Denmark) at 1:400 dilution in 1% BSA/PBS for 30 minutes in a moisture chamber at room temperature and revealed with 0.05% diaminobenzidine (DAB) in 0.3% H₂O₂ during 2 minutes. The counterstaining was performed with nuclear fast red for 1 minute. Finally, the samples were dehydrated, washed in xylene and mounted for later observation. As a negative control, one of the preparations was processed with the primary antibody replaced by PBS. Finally, samples were studied with an Olympus BX-51 light microscope and photographs were taken with an Olympus DP-25 digital camera connected to the microscope.

b) Double-fluorescence staining in order to make a second confirmation of the above observations. For this, two techniques were combined: TUNEL histochemistry followed by vimentin immunohistochemistry.

All aqueous dilutions were made with DNase-free water. Samples were dewaxed and rehydrated following the TUNEL technique protocol. Then, blocking with PBS/Glycine for 20 minutes at room temperature was followed by permeabilisation with Cytonin (Proteinase K is not recommended for this technique) for 1 hour at 37°C. After that, samples were incubated with an antibody against vimentin (Monoclonal mouse anti-vimentin clone V9, Dako Denmark) at 1:50 dilution in 1% PBS/BSA for 1h at 37°C followed by 3 rinses in DNase-free H₂O. At this point, the protocol for TUNEL technique was stopped before the Streptavidin-HRP revealed step. From this point, all steps were made in darkness. The samples were incubated jointly with both secondary antibody Alexa Fluor® 488 Goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, USA) diluted 1:400 for vimentin and Alexa Fluor® 594 Streptavidin-fluorescein conjugated (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) diluted 1:1000 for TUNEL for 45 minutes at room temperature. The samples were then washed in PBS 3 times, mounted with a specific fluorescence mounting medium (Dako, North America) and stored at 4°C overnight. Finally, the samples were studied with a fluorescence microscope (Zeiss Axiophot) provided with 2 fluorescence filters, allowing pictures of the distribution of vimentin filaments in green and TUNEL + cells in red to be captured at the same time. The pictures of both fluorescence spectra were merged using the Image J software.

Semiquantitative study

To determine the TUNEL+ activity of Sertoli cells in the different testicular regression groups, a semiquantitative study was performed, obtaining a Sertoli cell TUNEL+ index. For this, scanned TUNEL sections were used, and 10 random fields for each of the two scanned sections were used. Within each field, both TUNEL positive and negative Sertoli cells were counted and an index, as $(\text{TUNEL} + \text{Sertoli cells} / \text{Total number of Sertoli cell}) \times 100$ was calculated. Later, using vimentin stained sections, it was confirmed whether or not all TUNEL + cells with a similar morphology to Sertoli cells were really Sertoli cells.

In order to study the phagocytic activity of elongated spermatids from Sertoli cells, a count of the number of elongated spermatids phagocytized was made regarding with the constant number of 1600 Sertoli cells per regression group. For this, the SBA lectin histochemical technique was used, counting only those spermatids that were close to or below the nucleus of Sertoli cells.

Results

H&E revealed the existence of Sertoli cells, especially in groups MR and SR, with a morphology that was considerably altered at nucleus level, where a pronounced degree of flattening could be observed, accompanied by an increase in basophilia. This was also evident in semi-thin sections stained with toluidine blue. The TUNEL technique identified the presence of some cells, in the basal zone of the seminiferous epithelium as TUNEL + with a very similar morphology to that of Sertoli cells, next to germinal cells that were also positive. These TUNEL + cells were confirmed to be Sertoli cells by immunostaining for vimentin in the same sections. Finally the double immunofluorescence technique for TUNEL and vimentin confirmed the existence of Sertoli cell that were both vimentin + and TUNEL +.

Using TEM it was possible to identify Sertoli cells in the MR and SR groups that were morphologically quite different from normal cells. TEM also identified morphologically normal cells or cells with alterations both of which were to be expected during regression. Next to these, ultrastructural changes considered characteristic of cell death could be observed. The clearest initial changes were a flattening and increased cytoplasmic electron density of the Sertoli cell. Associated with this change in the cytoplasm, vesicular structures and degenerated mitochondria, along with dilatations of the Golgi apparatus, were observed. Also frequent in intermediate stages of degeneration was the accumulation of a granulose component in the cytoplasm, which seemed to represent numerous groups of free ribosomes.

Also clearly visible were changes in the cytoplasmic prolongations of the Sertoli cells, which lost contact with the adjacent germinal cells. As regards the nucleus of the Sertoli cells, wrinkling and a significant increase in chromatin electron density, compared with the typical nucleus of this type of cell were observed.

In more advanced stages of degeneration, a substantial diminution in the size of the Sertoli cells was accompanied by a greater degree of nuclear flattening and an increase in ribosome accumulation, while a dilation of the Golgi cisterns and of the mitochondria became more evident. In the final stages of degeneration, the nuclei showed high electron density and pronounced retraction of the cytoplasm, where only large vesicular structures and dilations could be seen. This phenomenon was evident until the total condensation and fragmentation of the nucleus in the final stages of Sertoli cell death.

In the semi-quantitative study of the Sertoli cell death phenomenon during testicular regression due to short photoperiod, it was observed that the index of TUNEL+ Sertoli cells in the MR (1.45 ± 0.33) and SR (0.95 ± 0.15) groups was significantly higher than in the TR group (0.30 ± 0.05) ($P < 0.05$). No significant differences between MR and SR groups were observed.

As regards the phagocytic activity of Sertoli cells in the seminiferous epithelium, besides phagocytizing the apoptotic remains of spermatogonia, spermatocytes and round spermatids, the Sertoli cells also phagocytized elongated spermatids which, as a consequence, were not expelled to the tubular lumen. The first observations of this event were made by light microscopy using H&E staining, semi-thin sections, SBA lectin histochemistry and by TUNEL, which occasionally identified TUNEL + elongated spermatids. In all cases, it was possible to identify elongated spermatids in the vicinity of the nuclei of Sertoli cells and in basal positions of the same, observations that were confirmed by TEM.

TEM also identified heads of elongated spermatids into vacuoles in basal positions of the seminiferous epithelium and even portions of spermatids close to the nuclei of Sertoli cells. These Sertoli cells showed completely normal ultrastructural characteristics, with well-developed nucleus and normal cytoplasm although, generally, a large quantity of lipidic vacuoles, typical of cells in regression was observed. This phagocytosis of elongated spermatids was evident in groups MR and SR, but not in TR in which spermatogenesis only progressed as far as the round spermatid stage.

In the semi-qualitative study of the phagocytic activity of elongated spermatids from Sertoli cells, a high phagocytic activity was observed in the MR group ($14.03 \pm$

0.92). This activity was lower, though not significantly so, in the SR group (9.45 ± 1.81), while in the TR group, phagocytic activity was significantly lower (0.60 ± 0.33) ($P < 0.05$) than in the other two regression groups.

4. CONCLUSIONS

1.- During testicular regression due to the exposure to short photoperiod in the Syrian hamster an initial decrease in the proliferation of spermatogonia and an increase in germ cell apoptosis occur at cellular level in the seminiferous epithelium. At the end of regression, proliferative activity recovers in the case of spermatogonia, while the apoptotic activity continues to mainly affect spermatocytes. Histomorphometrically, two phenomena occur: on the one hand, a decrease in both tubular diameter and tubular volume and on the other hand, a shortening of the seminiferous tubule with a decrease of interstitial volume. These phenomena are closely related to what occurs in the seminiferous epithelium regarding the proliferation and apoptosis of germ cells (**Article 1**).

2.- For the first time in mammals, lectins histochemistry in histological sections was seen to be a very useful tool for identifying apoptotic spermatocytes and spermatids since it is possible to use specific lectins to identify these germ cells. Furthermore, the lectin PNA identifies apoptotic Sertoli cells. Therefore, the implementation of lectin histochemistry in our regression model of the seminiferous epithelium can be considered an appropriate tool for quantifying the degree of apoptosis as regards the time of regression, the type of cell affected and the stage which the cell undergoing apoptosis has reached (**Article 2**).

3.- There is clear morphological evidence that Sertoli cells suffer death through apoptosis during testicular regression due to short photoperiod in the Syrian hamster. Furthermore, it is noted that the phagocytic capacity of the Sertoli cell is not restricted to apoptotic debris of spermatogonia, spermatocytes and round spermatids but also spermatids elongated during testicular regression due to short photoperiod are phagocytized (**Article 3**).

5. ARTÍCULOS

ARTICLES

5.1- Artículo 1

Article 1

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

Luis M. Pastor, Department of Cellular Biology and Histology, School of Medicine, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain.
E-mail: bioetica@um.es

Keywords:

apoptosis, hamster, photoperiod, proliferation, seasonal reproduction, testes

Received: 12-Dec-2014

Revised: 9-Feb-2015

Accepted: 5-Mar-2015

doi: 10.1111/andr.12037

Testicular histomorphometry and the proliferative and apoptotic activities of the seminiferous epithelium in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) during regression owing to short photoperiod

¹V. Seco-Rovira, ¹E. Beltrán-Frutos, ¹C. Ferrer, ²F. J. Saez, ¹J. F. Madrid, ³M. Canteras and ¹L. M. Pastor

¹Department of Cell Biology and Histology, Medical School, IMIB-Arrixaca, Regional Campus of International Excellence Campus Mare Nostrum, University of Murcia, Murcia, ²Department of Cell Biology and Histology UFI 11/44, School of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa, and ³Department of Statistics, Medical School, University of Murcia, Murcia, Spain

SUMMARY

During the non-breeding season some animals exhibit testicular atrophy, decreased testicular weight and reduced seminiferous tubule diameter accompanied by depletion of the seminiferous epithelium. Some cellular factors involved in this depletion are changes in germ cell proliferation and apoptosis. In the Syrian hamster this depletion has been studied histologically and in terms of the involvement of proliferation and apoptosis in the seminiferous epithelium of fully regressed testes. The objectives of this study included the histomorphometrical characterization of the testis and the determination of the proliferative and apoptotic activity of germ cells in the seminiferous epithelium during testicular regression owing to short photoperiod. The study was performed using conventional light microscopy (hematoxylin and eosin), proliferating cell nuclear antigen and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP in situ nick end labelling staining, image analysis software, and transmission electron microscopy in three established regression groups: mild regression (MR), strong regression (SR), and total regression (TR). Morphometrically a gradual decrease in total tubular area and in the testicular, tubular, and epithelial volumes was observed during testicular regression. Interstitial and luminal volumes decreased from the MR group onwards. The tubular length decreased from MR to SR. As regards spermatogonial proliferation, only an initial decrease in proliferative activity was observed, whereas apoptotic germ cell activity increased throughout regression. The number of germ cells studied decreased throughout the process of testicular regression. In conclusion, testicular regression in Syrian hamster comprises two histomorphometrical phases, the first involving a decrease in seminiferous tubular diameter and volume and the second involving shortening of the seminiferous tubule and a decrease in interstitial volume. At the cellular level, there is an initial decrease in proliferation and increase in apoptosis involving all germ cells. At the end of regression, the proliferative and apoptotic activities of the spermatogonia recover the values observed prior to regression in preparation for recrudescence.

URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/andr.12037/abstract>

5.2- Artículo 2

Article 2

Lectin Histochemistry as a Tool to Identify Apoptotic Cells in the Seminiferous Epithelium of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Subjected to Short Photoperiod

V Seco-Rovira¹, E Beltrán-Frutos¹, C Ferrer¹, MM Sánchez-Huertas¹, JF Madrid¹, FJ Saez² and LM Pastor¹

¹Department of Cell Biology and Histology, Medical School, IMIB, Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Murcia, Spain; ²Department of Cell Biology and Histology UF111/44, School of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country, UPV/EHU, Leioa, Spain

Abstract

Lectins have been widely used to study the pattern of cellular glycoconjugates in numerous species. In the process of cellular apoptosis, it has been observed that changes occur in the membrane sugar sequences of these apoptotic cells. The aim of our work was to identify which lectins, out of an extensive battery of the same (PNA, SBA, HPA, LTA, Con-A, UEA-I, WGA, DBA, MAA, GNA, AAA, SNA), show affinity for germinal cells in apoptosis, at what stage of cell death they do so and in which germinal cell types they can be detected. For this, we studied testis sections during testicular regression in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) subjected to short photoperiod. Several lectins showed an affinity for the glycoconjugates residues of germ cells in apoptosis: Gal β 1,3-GalNAc α 1, α D-mannose, N-acetylgalactosamine and L-fucose. Furthermore, lectin specificity was observed for some specific germinal cells and in certain stages of apoptosis. It was also observed that one of these lectins (PNA) showed affinity for Sertoli cells undergoing apoptosis. Therefore, we conclude that the use of lectin histochemistry could be a very useful tool for studying apoptosis in the seminiferous epithelium because of the specificity shown towards germinal cells in pathological or experimentally induced epithelial depletion models.

URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12196/abstract>

5.3- Artículo 3

Article 3

The Death of Sertoli Cells and the Capacity to Phagocytize Elongated Spermatids During Testicular Regression due to Short Photoperiod in Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*)¹

Vicente Seco-Rovira,³ Esther Beltrán-Frutos,³ Concepción Ferrer,³ Francisco José Sáez,⁴ Juan Francisco Madrid,³ and Luis Miguel Pastor^{2,3}

³Department of Cell Biology and Histology, Medical School, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, Regional Campus of International Excellence “Campus Mare Nostrum,” University of Murcia, Murcia, Spain

⁴Department of Cell Biology and Histology Unidad de Formación e Investigación 11/44, School of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Spain

Abstract

In the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*), an animal that displays testicular regression due to short photoperiod, germ cells are removed by apoptosis during this process and the apoptotic remains are phagocytized by Sertoli cells. The aim of this work was to investigate morphologically whether the testicular regression process due to short photoperiod leads to the apoptosis of Sertoli cells, and whether, during testicular regression, the elongated spermatids are eliminated through phagocytosis by Sertoli cells. To this end, we studied testis sections during testicular regression in Syrian hamster subjected to short photoperiod by means of several morphological techniques using conventional light microscopy (hematoxylin and eosin [H&E], semi-thin section vimentin, immunohistochemistry, SBA lectin, and TUNEL staining), fluorescence microscopy, and transmission electron microscopy (TEM). H&E and semi-thin sections identified Sertoli cells with a degenerated morphology. Greater portion of Sertoli cells that were positive for TUNEL staining were observed especially during the mild regression (MR) and strong regression (SR) phases. In addition, TEM identified the characteristic apoptotic changes in the nucleus and cytoplasm of Sertoli cells. Moreover, during testicular regression and using light microscopy, some elongated spermatids were seen in basal position next to the Sertoli cell nucleus. This Sertoli phagocytic activity was higher in MR and SR phases. TEM confirmed this to be the result of the phagocytic activity of Sertoli cells. In conclusion, during testicular regression in Syrian hamster due to short photoperiod, when germ cells are known to be lost through apoptosis, there is morphological evidences that Sertoli cells are also lost through apoptosis, while some elongated spermatids are phagocytized and eliminated by the Sertoli cells.

URL: <http://www.biolreprod.org/content/90/5/107.abstract>

6. BIBLIOGRAFÍA

REFERENCES

Araújo, R. A., Amaro, B. D., Talamoni, S. A. & Godinho, H. P. (2013). Seasonal reproduction of yellowish myotis, *Myotis levis* (Chiroptera: Vespertilionidae), from a Neotropical highland. *Journal of Morphology*, 274(11), 1230-1238.

Arya, M. & Vanha-Perttula, T. (1984). Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis. *Andrologia*, 16(6), 495-508.

Arya, M. & Vanha-Perttula, T. (1986). Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse, and nutria. *American Journal of Anatomy*, 175(4), 449-469.

Aumüller, G., Steinbrück, M., Krause, W. & Wagner, H.J. (1988). Distribution of vimentin-type intermediate filaments in Sertoli cells of the human testis, normal and pathologic. *Anatomy and Embryology (Berl)*, 178(2), 129-136.

Avilés, M., El-Mestrah, M., Jaber, L., Castells, M. T., Ballesta, J. & Kan, F. W. (2000). Cytochemical demonstration of modification of carbohydrates in the mouse zona pellucida during folliculogenesis. *Histochemistry and Cell Biology*, 113(3), 207-219.

Avilés, M., Martínez-Menárguez, J. A., Castells, M. T., Madrid, J. F. & Ballesta, J. (1994). Cytochemical characterization of oligosaccharide side chains of the glycoproteins of rat zona pellucida: an ultrastructural study. *The Anatomical Record*, 239(2), 137-149.

Badia, E., Pinart, E., Briz, M., Pastor, L. M., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Bassols, J., Kádár, E., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M. & Bonet, S. (2005). Lectin histochemistry of the boar bulbourethral glands. *European Journal of Histochemistry*, 49(2), 131-138.

Ballesta, J., Martínez-Menárguez, J. A., Pastor, L. M., Avilés, M., Madrid, J. F. & Castells, M. T. (1991). Lectin binding pattern in the testes of several tetrapode vertebrates. *Europeana Journal of Basic and Applied Histochemistry*, 35(2), 107-117.

Barnes, B. M., Kretzmann, M., Licht, P. & Zucker, I. (1986). The influence of hibernation on testis growth and spermatogenesis in the golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Biology of Reproduction*, 35(5), 1289-1297.

Berensztein, E. B., Sciara, M. I., Rivarola, M. A. & Belgorosky, A. (2002). Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty: high rate of testicular growth in newborns mediated by decreased apoptosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(11), 5113-5118.

Berndtson, W. E., Squires, E. L. & Thompson, D. L. (1983). Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. *Theriogenology*, 20(4), 449-457.

Blanco-Rodríguez, J. & Martínez-García, C. (1996). 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(4), 237-247.

Blanco-Rodríguez, J. & Martínez-García, C. (1999). Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Biology of Reproduction*, 61(6), 1541-1547.

Blottner, S., Hingst, O. & Meyer, H. H. (1995). Inverse relationship between testicular proliferation and apoptosis in mammalian seasonal breeders. *Theriogenology*, 44(3), 321-328.

Blottner, S., Schön, J. & Jewgenow, K. (2006). Seasonally activated spermatogenesis is correlated with increased testicular production of testosterone and epidermal growth factor in mink (*Mustela vison*). *Theriogenology*, 66(6-7), 1593-1598.

Blottner, S., Schön, J. & Roelants, H. (2007). Apoptosis is not the cause of seasonal testicular involution in roe deer. *Cell Tissue and Research*, 327(3), 615-624.

Calvo, A., Pastor, L. M., Horn, R. & Pallares, J. (1995). Histochemical study of glycoconjugates in the epididymis of the hamster (*Mesocricetus auratus*). *The Histochemical Journal*, 27(9), 670-680.

Calvo, A., Pastor, L. M., Bonet, S., Pinart, E. & Ventura, M. (2000). Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120(2), 325-335.

Castells, M. T., Ballesta, J., Pastor, L. M., Madrid, J. F. & Marin, J. A. (1990). Histochemical characterization of glycoconjugates in the epithelium of the extrapulmonary airways of several vertebrates. *The Histochemical Journal*, 22(1), 24-35.

Cheng, C. Y. & Mruk, D. D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological Reviews*, 82(4), 825-874.

Dadhich, R. K., Real, F. M., Zurita, F., Barrionuevo, F. J., Burgos, M., & 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(1), 83-91.

Dadhich, R. K., Barrionuevo, F. J., Real, F. M., Lupiañez, D. G., Ortega, E., Burgos, M. & Jiménez, R. (2013). Identification of live germ-cell desquamation as a major mechanism of seasonal testis regression in mammals: a study in the Iberian mole (*Talpa occidentalis*). *Biology of Reproduction*, 88(4), 101.

De Krester D.M. & Kerr J.B. (1994). The Cytology of the Testis. In E. Knobil & J. Neil (Eds). *The Physiology of Reproduction*: Vol. 1. (pp 1177-1290). New York: Raven Press.

Floderus S. (1944). Untersuchungen über den Bauder menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen verhältnisse. *Acts Pathological and Microbiological Scandinavica*. Suppl 53, 1-276.

Foreman, D. (1997). Seminiferous tubule stages in the prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) during the annual breeding cycle. *The Anatomical Record*, 247(3), 355-367.

Gerlach, T. & Aurich, J.E. (2000). Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*, 58(3-4), 197-213.

Gottreich, A., Hammel, I., Yogev, L. & Terkel, J. (1995). Quantitative microscopic changes in the mole rat testes during an annual cycle. *The Anatomical Record*, 243(2), 195-199.

Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9(4), 411-416.

Hayashi, T., Kageyama, Y., Ishizaka, K., Kihara, K. & Oshima, H. (2002). Involvement of apoptosis in the control of Sertoli and pre-meiotic germ cell numbers in the developing rabbit testis. *Andrologia*, 34(1), 34-40.

Hikim, A. P., Wang, C., Leung, A. & Swerdloff, R. S. (1995). Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 136(6), 2770-2775.

Hikim, A. P., Wang, C., Lue, Y., Johnson, L., Wang, X. H. & Swerdloff, R. S. (1998). Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(1), 152-156.

Hochereau-de Reviers, M. T. & Lincoln, G. A. (1978). Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54(2), 209-213.

Hochereau-de Reviers, M. T., Perreau, C. & Lincoln, G. A. (1985). Photoperiodic variations of somatic and germ cell populations in the Soay ram testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 74(2), 329-334.

Hochereau-de Reviers, M. T., Perreau, C., Pisselet, C., & Pelletier, J. (1992). Effect of a 2-month light cycle regimen on testicular parameters of adult Ile-de-France rams. *Microscopy Research and Technology*, 20(3), 268-273.

Islam, M. N., Zhu, X. B., Zhu, Z. B., Aoyama, M. & Sugita, S. (2010). Histological and morphometric analyses of seasonal testicular variations in the Jungle Crow (*Corvus macrorhynchos*). *Anatomical Science International*, 85(3), 121-129.

Islam, M. N., Tsukahara, N. & Sugita, S. (2012). Apoptosis-mediated seasonal testicular regression in the Japanese Jungle Crow (*Corvus macrorhynchos*). *Theriogenology*, 77(9), 1854-1865.

Jenkins, L. K., Ross, W. L., & Young, K. A. (2007). Increases in apoptosis and declines in Bcl-XL protein characterize testicular regression in American crows (*Corvus brachyrhynchos*). *Reproduction, Fertility and Development*, 19(3), 461-469.

Jones, C. J., Morrison, C. A. & Stoddart, R. W. (1992). Histochemical analysis of rat testicular glycoconjugates. 2. Beta-galactosyl residues in O- and N-linked glycans in seminiferous tubules. *The Histochemical Journal*, 24(6), 327-336.

Kasper, M. & Singh, G. (1995). Epithelial lung cell marker: current tools for cell typing. *Histology and Histopathology*, 10(1), 155-169.

Kerr, J.B., Millar, M., Maddocks, S. & Sharpe, R.M. (1993). Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *The Anatomical Record*, 235(4), 547-559.

Kurohmaru, M., Kanai, Y. & Hayashi, Y. (1991). Lectin-binding patterns in the spermatogenic cells of the shiba goat testis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 53(5), 893-897.

Kurohmaru, M., Kobayashi, H., Kanai, Y., Hattori, S., Nishida, T., & Hayashi, Y. (1995). Distribution of lectin binding in the testes of the musk shrew, *Suncus murinus*. *Journal of Anatomy*, 187 (Pt 2), 323-329.

Kurohmaru, M., Maeda, S., Suda, A., Hondo, E., Ogawa, K., Endo, H., Kimura, J., Yamada, J., Rerkamnuaychoke, W., Chungsamarnyart, N., Hayashi, Y. & Nishida, T. (1996). An ultrastructural and lectin-histochemical study on the seminiferous epithelium of the common tree shrew (*Tupaia glis*). *Journal of Anatomy*, 189 (Pt 1), 87-95.

Liguoro, A., Prisco, M., Mennella, C., Ricchiari, L., Angelini, F. & Andreuccetti, P. (2004). Distribution of terminal sugar residues in the testis of the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Molecular Reproduction and Development*, 68(4), 524-530.

Lincoln, G.A. (1981). Seasonal aspects of testicular function. In H. Burger & D. de Kretser (Eds.), *The Testis* (pp. 255-302). New York: Raven Press.

Loo, D. T. (2011). In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods in Molecular Biology*, 682, 3-13.

Loveland, K. L. & Schlatt, S. (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *Journal of Endocrinology*, 153(3), 337-344.

Luaces, J. P., Rossi, L. F., Merico, V., Zuccotti, M., Redi, C. A., Solari, A. J., Merani, M. S. & Garagna, S. (2013). Spermatogenesis is seasonal in the large hairy armadillo, *Chaetophractus villosus* (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia). *Reproduction, Fertility and Development*, 25(3), 547-557.

Lue, Y., Hikim, A. P., Wang, C., Bonavera, J. J., Baravarian, S., Leung, A. & Swerdloff, R. S. (1997). Early effects of vasectomy on testicular structure and on germ cell and macrophage apoptosis in the hamster. *Journal of Andrology*, 18(2), 166-173.

Madekurozwa, M. C., Chabvepi, T. S., Matema, S. & Teerds, K. J. (2002). Relationship between seasonal changes in spermatogenesis in the juvenile ostrich (*Stuthio camelus*) and the presence of the LH receptor and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Reproduction*, 123(5), 735-742.

Madrid, J. F., Hernández, F. & Ballesta, J. (1997). Characterization of glycoproteins in the epithelial cells of human and other mammalian gallbladder. A review. *Microscopy Research and Technique*, 38(6), 616-630.

Madrid, J. F., Leis, O., Díaz-Flores, L., Sáez, F. J., & Hernández, F. (1998). Lectin-gold localization of fucose residues in human gastric mucosa. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 46(11), 1311-1320.

Martínez-Menárguez, J. A., Ballesta, J., Avilés, M., Castells, M. T. & Madrid, J. F. (1992). Cytochemical characterization of glycoproteins in the developing acrosome of rats. An ultrastructural study using lectin histochemistry, enzymes and chemical deglycosylation. *Histochemistry*, 97(5), 439-449.

Meachem, S. J., Stanton, P. G. & Schlatt, S. (2005). Follicle-stimulating hormone regulates both Sertoli cell and spermatogonial populations in the adult photoinhibited Djungarian hamster testis. *Biology of Reproduction*, 72(5), 1187-1193.

Morales, E., Pastor, L. M., Ferrer, C., Zuasti, A., Pallarés, J., Horn, R., Calvo, A., Santamaría, L. & Canteras, M. (2002). Proliferation and apoptosis in the seminiferous epithelium of photoinhibited Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *International Journal of Andrology*, 25(5), 281-287.

Morales, E., Pastor, L. M., Horn, R., Zuasti, A., Ferrer, C., Calvo, A., Santamaría, L. & Canteras, M. (2003). Effect of ageing on the proliferation and apoptosis of testicular germ cells in the Syrian hamster *Mesocricetus auratus*. *Reproduction, Fertility and Development*, 15(1-2), 89-98.

Morales, E., Polo, L. A., Pastor, L. M., Santamaría, L., Calvo, A., Zuasti, A. & Ferrer, C. (2005). Characterization of corpora amylacea glycoconjugates in normal and hyperplastic glands of human prostate. *Journal of Molecular Histology*, 36(4), 235-242.

Nicolson, G. L., Usui, N., Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. & Smith, J. R. (1977). Lectin-binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa. Changes in surface receptors during epididymal Maturation and after ejaculation. *The Journal of Cell Biology*, 74(3), 950-962.

Nistal, M., Garcia-Rodeja, E. & Paniagua, R. (1991). Granular transformation of Sertoli cells in testicular disorders. *Human Pathology*, 22(2), 131-137.

O'Donnell L., Nicholls, P. K., O'Bryan M. K., McLachlan R. I. & Stanton P. G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1(1), 14-35.

Pastor, L. M., Frutos, M. J., Graña, L., Ramos, D., Gallego-Huidobro, J. & Calvo, A. (1992). Histochemical study of glycoconjugates in the nasal mucosa of the rat and guinea pig. *The Histochemical Journal*, 24(10), 727-736.

Pastor, L. M., Ferran, A., Calvo, A., Sprekelsen, C., Horn, R., & Marin, J. A. (1994). Morphological and histochemical study of human submucosal laryngeal glands. *The Anatomical Record*, 239(4), 453-467.

Pastor, L. M., Morales, E., Polo, L. A., Calvo, A., Pallarés, J. & De La Viesca, S. (2003). Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Histochemica*, 105(2), 165-173.

Pastor, L. M., Lucas, X., Pallares, J., Bernal-Mañas, C. M., Martinez, E. A., Roca, J., Vazquez J. M., Morales E., Beltran E., Zuasti A. & Ferrer, C. (2008). Characterization of glycoside residues of porcine zona pellucida and ooplasm during follicular development and atresia. *Molecular Reproduction and Development*, 75(9), 1473-1483.

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(1), 91-117.

Perez-Tomas, R., Ballesta, J., Madrid, F. J., Pastor, L. M. & Hernandez, F. (1990). Histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of the tortoise *Testudo graeca* (Testudines). *Journal of Morphology*, 204(3), 235-245.

Phillips, B. T., Gassei, K. & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1663-1678.

Pinart, E., Bonet, S., Briz, M., Pastor, L. M., Sancho, S., García, N., Badía, E. & Bassols, J. (2001). Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid post-pubertal boars. *International Journal of Andrology*, 24(3), 153-164.

Pinart, E., Sancho, S., Briz, M. D., Bonet, S., Garcia, N. & Badia, E. (2000). Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism. *Journal of Morphology*, 244(3), 190-202.

Ramos, A. S. & Dym, M. (1979). Ultrastructural differentiation of rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 21(4), 909-922.

Roth, J., Zuber, C., Komminoth, P., Sata, T., Li, W. P. & Heitz, P. U. (1996). Applications of immunogold and lectin-gold labeling in tumor research and diagnosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 106(1), 131-148.

Roth, J. (2011). Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochemistry and Cell Biology*, 136(2), 117-130.

Santamaría, L., Martín, R., Codesal, J. & Paniagua R. (1995). Myoid cell proliferation in rat seminiferous tubules after ischaemic testicular atrophy induced by epinephrine. Morphometric and immunohistochemical (bromo-deoxyuridine and PCNA) studies. *International Journal of Andrology*, 18(1), 13-22.

Schwarz, M. A. & Koehler, J. K. (1979). Alterations in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 21(5), 1295-1307.

Schön, J., Göritz, F., Streich, J. & 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 (Berl)*, 208(2), 151-159.

Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C. & Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125(6), 769-784.

Simeunovic, B., Strbenc, M. & Bavdek, S. V. (2000). Position and histological structure of the testes in the brown hare (*Lepus europaeus*) during seasonal regression and recrudescence. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 29(2), 73-82.

Sinha Hikim, A. P., Bartke, A. & Russell, L. D. (1988). Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biology of Reproduction*, 39(5), 1225-1237.

Sinha Hikim, A. P., Rajavashisth, T. B., Sinha Hikim, I., Lue, Y., Bonavera, J. J., Leung, A., Wang, C. & Swerdloff, R. S. (1997). Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biology of Reproduction*, 57(5), 1193-1201.

Sinha Hikim, A. P. & Swerdloff, R. S. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction*, 4(1), 38-47.

Spicer, S. S. (1993). Advantages of histochemistry for the study of cell biology. *The Histochemical Journal*, 25(8), 531-547.

Strbenc, M., Fazarinc, G., Bavdek, S. V., & Pogacnik, A. (2003). Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the brown hare (*Lepus europaeus* L.). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 32(1), 48-53.

Suda, A., Hashimoto, O., Ogawa, K., Kurohmaru, M., & Hayashi, Y. (1998). Distribution of lectin binding in spermatogonia of Syrian hamsters in gonadally active and inactive states. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60(2), 189-195.

Söderström, K. O., Malmi, R. & Karjalainen, K. (1984). Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid. *Histochemistry*, 80(6), 575-579.

Tsubota, T., Howell-Skalla, L., Nitta, H., Osawa, Y., Mason, J. I., Meiers, P. G., Nelson, R. A. & Bahr, J. M. (1997). Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109(1), 21-27.

Tähkä, K. M., Zhuang, Y. H., Tähkä, S. & Tuohimaa, P. (1997). Photoperiod-induced changes in androgen receptor expression in testes and accessory sex glands of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Biology of Reproduction*, 56(4), 898-908.

Wine, R. N., & Chapin, R. E. (1997). Evaluation of the binding patterns of eleven FITC-conjugated lectins in Fischer 344 rat testes. *Journal of Andrology*, 18(1), 71-79.

Wing, T.Y. & Christensen, A.K. (1982). Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *American Journal of Anatomy*, 165(1), 13-25.

Xia, Y., Zhu, W. J., Hao, S. F., Liang, W. B., & Li, J. (2012). Stereological analysis of age-related changes of testicular peritubular cells in men. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 55(1), 116-119.

Young, K. A. & Nelson, R. J. (2001). Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction*, 122(5), 677-685.

7. RESUMEN CORTO

ABSTRACT

Resumen corto

El hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) es un roedor de reproducción estacional en días largos que sufre una fuerte atrofia testicular cuando es sometido a un fotoperiodo corto. La presente tesis doctoral tiene como objetivos, en primer lugar, estudiar las variaciones histomorfométricas que tienen lugar en el testículo durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto así como determinar la importancia que tienen los fenómenos de proliferación y apoptosis en el proceso de atrofia del epitelio seminífero durante este periodo; en segundo lugar, dilucidar si la histoquímica de lectinas “in situ” permite identificar células germinales y/o somáticas en apoptosis durante esta regresión; finalmente, determinar si existe muerte celular de células de Sertoli durante esta regresión y si se produce por apoptosis. Para ello, se utilizaron 50 hámsteres sirios macho jóvenes sometidos a un fotoperiodo de 14:10h luz-oscuridad. Cinco machos se utilizaron como grupo de control mantenidos con el fotoperiodo de 14:10 h de luz-oscuridad. Los otros animales fueron sometidos a un fotoperiodo corto de 8:16h de luz-oscuridad. A las 4, 6, 8, 10 y 12 semanas se sacrificaron nueve animales tratados más un control, se extrajeron sus testículos y se procesaron para su estudio tanto con microscopía de luz (H&E, histoquímica de lectinas y TUNEL e inmunohistoquímica de PCNA y vimentina) como con microscopía electrónica de transmisión (MET). Mediante microscopía de luz se realizaron diversos estudios semicuantitativos. Con ellos y los del tiempo de sacrificio se establecieron tres grupos de regresión: regresión media (MR), regresión fuerte (SR) y regresión total (TR). Se calcularon también los índices de proliferación y apoptosis de las diferentes células germinales y somáticas del epitelio seminífero. Además, se realizaron estudios cuantitativos utilizando un software de análisis de imagen. Mediante la MET se estudiaron los cambios en las células germinales y de Sertoli durante la apoptosis. Durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto se produjo, a nivel celular en el epitelio seminífero, un descenso inicial de la proliferación en espermatogonias y un aumento de la apoptosis de células germinales. Al final de la regresión, se recuperó la actividad proliferativa de espermatogonias aunque la actividad apoptótica continuó afectando principalmente a los espermatocitos. Histomorfométricamente se produjo tanto un descenso del diámetro y volumen tubular como, un acortamiento del túbulo seminífero con un descenso del volumen intersticial. Varias lectinas mostraron afinidad por residuos de glucoconjugados de células germinales en apoptosis: Gal β 1,3-GalNAc α 1, α -D-manosa,

N-acetilgalactosamina y L-fucosa. Además, la lectina PNA mostró afinidad por células de Sertoli que se encontraban en apoptosis. La H&E y las secciones semifinas identificaron células de Sertoli con una morfología alterada siendo algunas TUNEL+ en los grupos MR y SR. Mediante MET se identificaron cambios característicos de la apoptosis en estas células. Por otra parte, durante la regresión testicular, se observaron, con microscopía de luz, espermátidas elongadas fagocitadas por células de Sertoli mayoritariamente en los grupos MR y SR. En conclusión: a) la regresión testicular en el hámster sirio conlleva, tanto un descenso del diámetro y volumen del túbulo seminífero como el acortamiento del túbulo seminífero y un descenso del volumen intersticial. Además, hay un descenso inicial en la proliferación y un incremento en la apoptosis de las células germinales. Al final de la regresión, las actividades proliferativa y apoptótica de las espermatogónias recuperan los valores anteriores a la regresión; b) el uso de la histoquímica de lectinas podría ser una herramienta muy útil para estudiar la apoptosis en el epitelio seminífero debido a la especificidad mostrada; c) hay evidencias morfológicas de la pérdida de células de Sertoli por apoptosis. También algunas espermátidas elongadas son fagocitadas y eliminadas por estas células de Sertoli.

Abstract

The Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) is a long-day seasonal breeding rodent which suffers strong testicular atrophy when subjected to a short photoperiod. The present thesis has as objectives: (i) to study the histomorphometrical changes that take place in the Syrian hamster testes during testicular regression due to a short photoperiod and to determine the importance of the phenomena of proliferation and apoptosis in the process of seminiferous epithelium atrophy during this period; (ii) to determine whether "in situ" lectin histochemistry allows the identification of germ and/or somatic cells in apoptosis during this regression; and iii) to determine whether Sertoli cell death occurs during regression and whether it is produced by apoptosis. For this purpose, 50 young Syrian hamsters subjected to a 14:10 h L:D photoperiod were used. Five males were maintained with this 14:10 h L:D photoperiod and used as Control. The other forty five animals were subjected to a short photoperiod of 8:16 h L:D. At 4, 6, 8, 10 and 12 week, nine treated animals plus one control were sacrificed, and their testes were extracted and processed for study both by light microscopy (H&E, lectin and TUNEL histochemistry techniques and PCNA and vimentin immunohistochemistry) and transmission electron microscopy (TEM). Using light microscopy, several semiquantitative studies were carried out. Based on these data and the week when the animals were sacrificed, three regression groups were established: mild regression (MR), strong regression (SR) and total regression (TR). The proliferation and apoptosis indexes of the different germinal and somatic cells of the seminiferous epithelium were calculated. Furthermore, quantitative studies were made using image analysis software. Using TEM the changes suffered by the different germ and Sertoli cells during apoptosis were studied. During testicular regression due to short photoperiod, an initial decrease in spermatogonia proliferation and an increase in germ cell apoptosis were observed at cellular level in the seminiferous epithelium. At the end of regression, the spermatogonial proliferative activity was recovered although the apoptotic activity continued, mainly affecting spermatocytes. Histomorphometrically, a decrease in tubular diameter and volume, shortening of the seminiferous tubules and a decrease in the interstitial volume were observed. Several lectins showed affinity for glycoconjugate residues (Gal β 1,3-GalNAc α 1, α -D-mannose, N-acetylgalactosamine and L-fucose) of germ cells in apoptosis. Furthermore, the PNA lectin showed affinity for Sertoli cells undergoing apoptosis. H&E and semi-thin sections identified Sertoli cells with a degenerated

morphology that were TUNEL+ in the MR and SR groups. Apoptotic changes in the nucleus and cytoplasm of these cells were identified by TEM. Moreover, during testicular regression and using light microscopy, some elongated spermatids were seen to have been phagocytosed by Sertoli cells, mainly in the MR and SR groups. In conclusion: a) testicular regression in Syrian hamster involves both a decrease in seminiferous tubular diameter and volume, and shortening of the seminiferous tubule accompanied by a decrease in interstitial volume. Furthermore, there is an initial decrease in proliferation and an increase in apoptosis involving all germ cells. At the end of regression, the proliferative and apoptotic activities of the spermatogonia recover the values observed prior to regression; b) lectin histochemistry can be considered a very useful tool for studying apoptosis in the seminiferous epithelium because of the specificity it shows; c) there is morphological evidence that some Sertoli cells are lost through apoptosis. Also, some elongated spermatids are phagocytized and eliminated by Sertoli cells.