

### **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

### ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

# Histología, actividad proliferativa y apoptótica

### durante la recrudescencia testicular tras

fotoperiodo corto en el epitelio seminífero

del hámster sirio

(Mesocricetus auratus)

Jesús Martínez Hernández

2020



## UNIVERSIDAD DE MURCIA FACULTAD DE MEDICINA

## Histología, actividad proliferativa y apoptótica durante la recrudescencia testicular producida tras fotoperiodo corto en el epitelio seminífero del hámster sirio (*Mesocricetus auratus*)

Jesús Martínez Hernández 2020

#### **TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

Testicular histomorphometry and the proliferative and apoptotic activities of the seminiferous epithelium in Syrian hamster during spontaneous recrudescence after exposure to short photoperiod. Martínez-Hernández J, Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos Ester, Ferrer C, Canteras M, Sánchez-Huertas MM y Pastor LM. (2018) *Reproduction in Domestic Animals* 53 (5), 1041–1051. DOI:10.1111/rda.13201

Lectin-binding pattern of glycoconjugates during spontaneous testicular recrudescence in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) after exposure to short photoperiod. Martínez-Hernández J, Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos Ester, Ferrer C, Serrano-Sánchez MI y Pastor LM. (2019) *Andrologia* **51** (1), e13148. DOI:10.1111/and.13148

Identification of proliferative and apoptotic sertoli cells using fluorescence and confocal microscopy. Martínez-Hernández J, Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Quesada-Cubo V, Ferrer C y Pastor LM. (2018) *Sertoli Cells. Methods in Molecular Biology*, vol **1748**, 49-60. Humana Press, New York, NY. **DOI**:10.1007/978-1-4939-7698-0\_5

Proliferation, apoptosis, and number of Sertoli cells in the Syrian hamster during recrudescence after exposure to short photoperiod. Martínez-Hernández J, Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos Ester, Ferrer C, Serrano-Sánchez MI y Pastor LM. (2020) *Biology Reproduction* **102** (3), 588–597. **DOI**:10.1093/biolre/ioz198

Los resultados de esta tesis doctoral fueron presentados previamente como comunicaciones orales o posters en diversos congresos internacionales siendo publicados como resúmenes en las revistas derivadas de dichos eventos científicos.

Proliferative and apoptotic activity changes in seminiferous epithelium of Syrian hamster (*Mesocricetus Auratus*) during recrudescence after to short photoperiod. Martínez-Hernández J, Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Ferrer C, Quesada-Cubo V, Canteras M y Pastor LM. (2015) *Histology and Histopathology*, Vol **30** (Suppl. 1), 3.

Death of Sertoli cells by apoptosis in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) in normal physiological conditions. Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Martínez-Hernández J, Quesada-Cubo V, Ferrer C y Pastor LM. (2015) *Histology and Histopathology*, Vol **30** (Suppl. 1), 48-49.

Apoptosis of Sertoli cells in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) during testicular recrudescence after exposure to a short photoperiod. Martínez-Hernández J, Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Ferrer C, Quesada-Cubo V y Pastor LM. (2016) *Reproduction in Domestic Animals,* Vol **51**, 114-115.

Proliferation and apoptosis of Sertoli cells in the syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) during recrudescence after exposure to short photoperiod. Martínez-Hernández J, Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Ferrer C, Canteras M y Pastor LM. (2017) *Histology and Histopahology*, Vol **32** (Suppl. 1), 25.

Lectin binding-pattern of glycoconjugates during testicular spontaneous recrudescence after exposure to short photoperiod in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). Seco-Rovira V, Martínez-Hernández J, Beltrán-Frutos E, Ferrer C y Pastor LM. (2017) *Histology and Histopahology*, Vol **32** (Suppl. 1), 106.

Proliferation, apoptosis and number of Sertoli cells in photoinhibited Syrian hamster testes (*Mesocricetus auratus*) owing to a short photoperiod. Martínez-Hernández J, Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Serrano-Sánchez MI, Ferrer C y Pastor LM. (2017) *Histology and Histopathology*, Vol **34** (Suppl. 1), 110.

Facultad de Medicina



### UNIVERSIDAD DE MURCIA

Luis Miguel Pastor García Catedrático de Biología Celular y Concepción Ferrer Cazorla Catedrática 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 recrudescencia testicular tras fotoperiodo corto en el epitelio seminífero del hámster sirio (*Mesocricetus auaratus*).

### Consideran:

Que es muy oportuna la presentación por parte del alumno de doctorado Jesús Martínez Hernández 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. Tres de los artículos se encuentran en JCR y el capítulo de libro en SJR.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos a 22 de Junio de 2020

duis U. Puetos

au cercion Ferrer

Departamento de Biología Celular e Histología Campus de Espinardo 30100 Murcial T 868 883949 http://www.um.es/web/biologia.celular/



D. LUIS MIGUEL PASTOR GARCÍA, Catedrático de Universidad del Área de BIOLOGÍA CELULAR (Area propia: Patología Humana) en el Departamento de BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Histología, actividad proliferativa y apoptótica durante la recrudescencia testicular tras fotoperiodo corto en el epitelio seminífero del hámster sirio (Mesocricetus auratus)", como compendio de publicaciones, realizada por D. JESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 7 de septiembre de 2020



ſ

Mod.T-20



### UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dñª CONCEPCIÓN FERRER CAZORLA catedrática de Universidad del Área de BIOLOGÍA CELULAR (Area propia: Patología Humana) en el Departamento de BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA,

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Histología, actividad proliferativa y apoptótica durante la recrudescencia testicular tras fotoperiodo corto en el epitelio seminífero del hámster sirio (Mesocricetus auratus)", como compendio de publicaciones, realizada por D. JESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 7 de septiembre de 2020



Mod.T-20

# AGRADECIMIENTOS

Han sido varios años los trascurridos hasta la llegada de este momento, la finalización de esta tesis doctoral. Durante estos años, he conocido a una gran cantidad de personas, todas y cada una de ellas me han ayudado de una u otra forma a conseguir ese objetivo. Sin su ayuda no creo que éste se hubiera materializado. A todos, gracias.

Las primeras personas que quiero agradecer son a mis directores de tesis, por haberme formado y guiado durante todos estos años. Al profesor **Luis Miguel Pastor** por su apoyo, conocimiento, paciencia, empatía y por su sentido práctico de las cosas, haciendo que todo fuera mucho más sencillo y llevadero. A la profesora **Concepción Ferrer**, de igual manera, por todos sus consejos y por saber que siempre estaría ahí dispuesta para ayudarme en todo lo que fuese necesario.

Al profesor **Vicente Seco** y la profesora **Ester Beltrán**, más que compañeros del grupo. A ambos por enseñarme todo el conocimiento del laboratorio y por ayudarme en todos los aspectos de esta tesis.

A los compañeros de laboratorio y del departamento, a **Leo**, **Rebeca**, **Julieta**, **Paula**, **Blanca** y **Carla** por estar siempre ahí dispuestos a echar una mano.

Al profesor **Manuel Canteras**, por ayudarme en el análisis estadístico de todos los trabajos de esta tesis doctoral.

A **Mari Carmen**, por enseñarme las técnicas del laboratorio y por su ayuda con el trabajo de microscopía.

A todo el departamento de Biología celular e Histología de la facultad de medicina por acogerme durante todo este tiempo y por todos sus consejos. En especial a los profesores Manolo Avilés, Emma Martínez, María Jiménez, José Ángel Martínez, Juan Francisco Madrid y María José Izquierdo.

Al servicio técnico **SAI**, a toda la sección de microscopia por todo el apoyo y ayuda durante las estancias con el microscopio electrónico y el microscopio confocal. En especial a **Manoli, Maruja**, **María Teresa** y **Paco**. También a toda la sección de cultivos celulares, en especial a **Pepe**, **Juana** y **Toñi**, que ya me ayudaron durante el master y lo han seguido haciendo durante toda la tesis.

Al profesor **Jordi Roca** y la profesora **Inmaculada Parrilla** del departamento de medicina y cirugía animal por estos años de colaboración, experiencia y trabajos realizados. A **Lorena** por todos sus viajes a por muestras y su predisposición para ayudarme.

Al profesor **Javier Campoy**, por toda su ayuda durante el año del master y por todo el conocimiento transmitido en las técnicas de bioquímica, aún después de no seguir en el departamento de Bioquímica como alumno, de forma tan desinteresada.

A **Marisa**, por toda la ayuda y compañía durante todos estos años, ya no solo durante la tesis, sino desde que comencé el master en el departamento de Bioquímica, que,

sumado a todo el tiempo en el laboratorio del **IMIDA**, has estado en todo momento para echarme una mano.

A todos los compañeros de las prácticas del **IMIDA** y en especial a los amigos que allí conocí, a **Laura**, a **Belén** y **Alejandro**, con los que pasé tan buenos momentos y que hicieron que el trabajo fuese más llevadero. También, a todas las personas que me ayudaron de la empresa **ITUM**, en especial a **Manolo**, **Rosa** y **Bea**.

A **Antonio**, compañero durante los cinco años de licenciatura y el año del master, el cual hizo que me planteara hacer una tesis doctoral y, en consecuencia, una carrera investigadora.

A todos mis amigos, **Jorge**, **Manuel**, **Javi**, **David**, **Noni**, **Chema**, **Nacho**, **Jesús A**., **Jesús B.** y **Emilio**, que siempre me han perdonado todos esos momentos que me perdí con ellos. También a los doteros de sesiones nocturnas, **Mave**, **Petey**, **amc** y **Lyner** con los cuales siempre sabía que echaría unas risas fedeando.

A toda mi familia, pero en especial a mi madre, mi padre, mis tías, mis hermanos y primos.

A **Marta**, por acompañarme y animarme en todo momento durante estos años de tesis. Sin tu apoyo hubiera sido todo más difícil. Gracias.

Por último, agradecer a la Fundación Séneca, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia por la financiación aportada en los proyectos 05741/PI/07, 04542/GERM/06, 04543/GERM/06, GERM 19892/15, que han permitido la realización de la presente tesis doctoral y al proyecto del ministerio AGL2015-69738-R, que me ha permitido disfrutar de un contrato asociado a él.

## ÍNDICE

	<u>Pag.</u>
1 Introducción General	1
2 Objetivos	13
3 Resumen general	17
3.1 Material y métodos	19
3.2 Diseño experimental y resultados	26
4 Conclusiones generales	53
5 Artículos	57
5.1 Artículo 1	59
5.2 Artículo 2	63
5.3 Capítulo de libro	67
5.4 Artículo 3	71
6 Bibliografía	75
7 Resumen corto	87

En la naturaleza, son muchos los mamíferos que presentan reproducción estacional. Ésta es considerada como una estrategia que siguen los animales para sincronizar los altos requerimientos biológicos de la reproducción con un ambiente favorable (Zucker, 2001). Es un modo de generar descendencia que implica que los animales tengan épocas en las cuales nacen nuevos individuos seguidos de otras en las cuales no. Éste fenómeno está regulado por varios factores, entre los que se encuentran la disponibilidad de la comida o la temperatura ambiental, aunque el más importante suele ser el número de horas de luz con respecto a las de oscuridad que hay en cada día, también conocido como fotoperiodo. En base al tipo de fotoperiodo, podemos distinguir entre animales cuyos periodos de reproducción (apareamiento y fecundación) acontece en días largos de luz (fotoperiodo largo) con periodos no reproductivos en días cortos de luz (fotoperiodo corto) y otros que sucede a la inversa, con periodos de reproducción en fotoperiodo corto y no reproductivos en fotoperiodo largo (Gerlach y Aurich, 2000). En conexión con esto, se ha observado que en los machos de las especies con reproducción estacional el peso de sus testículos disminuve en el periodo no reproductor. Esto está asociado a cambios histológicos testiculares como también con alteraciones hormonales que conllevan la pérdida de la fertilidad durante este periodo (Lincoln, 1981).

Con respecto a los cambios tisulares testiculares en mamíferos con reproducción estacional, se ha observado que estos se relacionan con su periodo no reproductor, sea éste en fotoperiodo corto o largo. En los periodos no reproductivos, los machos suelen padecer una infertilidad temporal y tanto su epitelio seminífero como el proceso de espermatogénesis se encuentra afectado en mayor o menor medida. Así, un primer tipo de cambios en el epitelio seminífero que se pueden observar en estos mamíferos es la reducción en la proliferación de las espermatogonias durante la estación no reproductora, afectando de manera cualitativa a la producción diaria de espermatozoides, pero manteniendo toda la serie de células germinales, como ocurre en el carnero (Hochereaude Reviers et al., 1985, 1992), el ciervo (Hochereau- de Reviers y Lincoln, 1978) o el potro (Berndtson et al., 1983), siendo muchas de estas especies las que se reproducen (apareamiento y fecundación) durante fotoperiodo corto. Un segundo tipo de cambios en el epitelio seminífero está relacionado con la detención de la espermatogénesis. En la época no reproductora -habitualmente en fotoperiodo corto-, puede observase microscópicamente secciones tubulares donde la espermatogénesis no progresa más allá del estado de espermátidas redondas. Esto ocurre en especies como el corzo (Schön et al., 2004), el oso negro (Tsubota et al., 1997), el topillo rojo (Tähkä et al., 1997), la ardilla (Barnes et al., 1986) o la liebre (Simeunovic et al., 2000). En otras especies, la detención de la espermatogénesis es a nivel de espermatocitos o espermatogonias como ocurre en el pichi peludo (Luaces et al., 2013), el visón (Pelletier, 1986, Blottner et al., 2006), el murciélago (Araújo et al., 2013) y el hámster sirio (Sinha Hikim et al., 1988).

En relación con la espermatogénesis, es conocido que para que ésta se produzca correctamente debe existir un equilibrio entre la proliferación y la apoptosis de las células, es decir, la proliferación y diferenciación de las espermatogonias frente a la apoptosis de todas las células germinales (De Krester y Kerr, 1994, Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1996, Loveland y Schlatt, 1997, Pastor et al., 2011).

Las espermatogonias, son células diploides que se localizan en la zona más próxima a la membrana basal de los túbulos seminíferos, proceden de la división de las células madre de espermatogonias (SSC). En roedores, con microscopia luz se pueden distinguir tres tipos principales de espermatogonías: tipo A, intermedias y B. Las espermatogonias tipo B presentan gran cantidad de heterocromatina en su núcleo, generalmente son más pequeñas y diferenciadas (Phillip et al., 2010). Éstas son las últimas en proliferar, generando en su división, los espermatocitos. En cuanto a las SSC, a pesar de representar menos del 1% de las células germinales en roedores, suponen la

base de la espermatogénesis, (Tegelenbosch y de Rooij, 1993), y se caracterizan, como cualquier otra célula madre, por mostrar un equilibrio entre su autorrenovación y su diferenciación en otras espermatogonias. Este equilibrio es esencial para mantener la población de SSC y responder a la necesidad de más espermatogonias manteniendo el funcionamiento normal del testículo (Phillip et al., 2010).

Respecto a la apoptosis, ésta se define como un fenómeno de muerte celular programada que se inicia a través de vías de señalización celular tanto intrínsecas como extrínsecas, y que activan unas proteínas denominadas caspasas que conducen, en última instancia, a la fragmentación del ADN nuclear (Rai et al., 2005). Este fenómeno está asociado a cambios morfológicos celulares como son la reducción del volumen celular, condensación y marginación de la cromatina, formación de vesículas en la membrana plasmática y la generación de los llamados cuerpos apotóticos (Häcker, 2000). Además, este tipo de muerte celular se caracteriza por presentar una rápida eliminación de los cuerpos apotóticos por parte de células con capacidad fagocítica y no lleva asociada una respuesta inflamatoria como ocurre en la muerte celular de carácter necrótico (Sinha Hikim y Swerdloff, 1999).

En muchos mamíferos, durante el proceso de espermatogénesis normal, se ha observado que la apoptosis de células germinales se produce de forma espontánea, especialmente de espermatogonias y espermatocitos a lo largo de los diversos estadios del ciclo seminífero como ocurre en la rata (Hikim et al., 1995, Sinha Hikim et al., 1997), el hámster (Lue et al., 1997) o el ser humano (Hikim et al., 1998).

Una célula muy importante en el epitelio seminífero es la de Sertoli debido a que tiene un papel clave en la espermatogénesis. La célula de Sertoli es la única célula somática dentro del epitelio seminífero; presenta una forma normalmente triangular con el núcleo polarizado en la zona basal y unas prolongaciones especializadas que actúan de sostén para el resto células germinales. Aunque realiza multitud de funciones, las más importantes son las de carácter estructural y funcional respecto al resto de las células del epitelio, suministrándoles nutrientes o señales externas necesarias, como, por ejemplo, factores de crecimiento para mantener la espermatogénesis (Griswold, 1998), además de participar en la regulación de la diferenciación de las células germinales (Cheng y Mruk, 2002). Es tal su implicación en la espermatogénesis, que el número diario de gametos masculinos producidos depende directamente del número de células se alcanza una vez llegada la pubertad (Lucas et al., 2014) y, para ello, esta célula se divide en determinados

momentos de la vida del individuo, como son durante el periodo fetal y la pubertad. En ellos ocurre un incremento del número total de células de Sertoli debido a su proliferación (Sharpe et al. 2003). Se sabe que hay hormonas que estimulan su división celular y otras que promueven su diferenciación como célula de Sertoli adulta. Así, por un lado, la hormona estimuladora de los folículos (FSH) promueve la proliferación de la célula de Sertoli mientras que la testosterona y la tirosina aceleran la diferenciación de ésta (Sharpe et al., 2003, Buzzard et al., 2003, Tarulli et al., 2012). Tradicionalmente se ha considerado que, una vez alcanzada la vida adulta, la célula de Sertoli es una célula totalmente diferenciada, y como consecuencia, quiescente. Esto supone que el número total de células de Sertoli es estable y no cambia durante la vida del individuo, no respondiendo ya a la hormona que previamente la estimulaban a dividirse (Ramos y Dym, 1979, Sharpe et al., 2003, Xia et al., 2012).

Actualmente estos hechos están bajo discusión, algunos autores han sugerido que la célula de Sertoli de individuos adultos puede cambiar de su estado maduro y diferenciado a un estado más inmaduro e indiferenciado por efecto de las gonadotropinas, planteando la existencia de una población de células de Sertoli que se encontraría en un estado dinámico y modificable por las hormonas, al menos, en reproductores estacionales como ocurre en el hámster ruso (Tarulli et al., 2012). A favor de esta hipótesis estaría que, con anterioridad, otros trabajos usando técnicas estereológicas ya habían descrito variaciones en el número de célula de Sertoli en individuos adultos del hámster ruso (Meachem et al., 2005, Meachem et al., 2007). Además, de forma paralela, en estudios *in vitro* se ha ido describiendo durante estos últimos años, la posibilidad de división de las células de Sertoli, ya que estas células expresan toda la "maquinaria proliferativa" necesaria para hacerlo (Ahmed et al., 2009, Kulibin y Malolina, 2016).

Solo recientemente, se ha descrito la proliferación de células de Sertoli en animales adultos. Así, en ratas Wistar bajo condiciones fisiológicas normales, se ha observado este fenómeno proliferativo en la zona de transición entre el túbulo seminífero y la *rete testis*, donde solo hay células de Sertoli y algunas espermatogonias. Los autores sugieren la existencia en esta zona de una subpoblación de células de Sertoli de carácter indiferenciado, desde ella tanto el túbulo seminífero como la población de células de Sertoli podrían crecer cuando esto fuera necesario (Figueiredo et al., 2016). Así mismo, en el hámster sirio, un año antes se había descrito en la misma zona (los autores la denominan: la válvula de Sertoli) un nicho de células de Sertoli proliferativas en individuos adultos y en condiciones fisiológicas normales (Aiyama et al., 2015).

De forma similar a lo observado en la actividad proliferativa de la célula de Sertoli ocurre también con la apoptótica. Durante años se ha afirmado que la apoptosis se producía en la célula de Sertoli en determinados periodos de la vida del individuo. Así, solo se había identificado durante la vida fetal, prenatal o prepuberal considerando que, alcanzada la edad adulta y siendo ya la célula quiescente, ésta sufría un proceso de envejecimiento, no cambiando su número (Sharpe et al. 2003). Frente a esto, en las últimas dos décadas se ha ido observando la existencia de apoptosis de células de Sertoli asociada a algunas patologías o tras la administración de fármacos o tóxicos (Heiskanen et al., 1996, Sasso-Cerri y Miraglia, 2002, Hu et al., 2018). También se ha observado la apoptosis de células de Sertoli en situaciones experimentales donde se provoca una depleción hormonal de FSH (Yagi et al., 2006). En condiciones fisiológicas normales, solamente durante la regresión del hámster ruso debida a fotoperiodo corto se ha podido determinar una disminución del número total de estas células, por métodos estereológicos, proponiéndose que este decrecimiento de la población podría ser causado por la apoptosis (Meachem et al., 2005).

Otro aspecto importante de la espermatogénesis es que, en ella, durante la formación y maduración de los espermatozoides, ocurren cambios en los glucoconjugados de las células del epitelio seminífero (Nicolson et al., 1977, Schwarz y Koehler, 1979). Las lectinas han sido ampliamente utilizadas para estudiar esos cambios y ellas se definen como proteínas de diverso origen (microbiano, fúngico, vegetal o animal) que reconocen específicamente los residuos de azúcar de las glucoproteínas y glucolípidos, mostrando un patrón de unión característico en los diversos órganos o tejidos analizados (Spicer, 1993).

De esta manera, estas proteínas han sido ampliamente utilizadas en la caracterización "in situ" (histoquímica de lectinas) de patrones específicos de carbohidratos en diversos tejidos y órganos como por ejemplo, el sistema respiratorio (Castells et al., 1990, Pastor et al., 1992, 1994, Kasper y Singh, 1995), el sistema digestivo (Perez-Tomás et al., 1990, Madrid et al., 1997, 1998), y los 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). En el caso de los estudios referentes al epitelio seminífero, mediante histoquímica de lectinas se ha observado un patrón diferente de glucoconjugados entre los distintos tipos de células germinales y de éstas respecto a la de Sertoli (Arya y Vanha-Perttula, 1984, 1986, Söderström et al., 1984; Kurohmaru et al.,

1991, Kurohmaru et al., 1995, Kurohmaru et al., 1996, Jones et al., 1992; Martínez-Menárguez et al., 1992, Martínez-Menárguez et al., 1993; Wine y Chapin, 1997; Calvo et al., 2000; Pinart et al., 2001). Además, recientemente se han mostrado que ésta histoquímica es una herramienta muy útil para identificar células apoptóticas en el epitelio seminífero (Seco-Rovira et al., 2013, Seco-Rovira et al., 2017).

El hámster sirio (Mesocricetus auratus), es un roedor con reproducción estacional muy utilizado en el laboratorio para estudios del control de la reproducción por fotoperiodo y usado como modelo para el estudio entre la relación estructura/función en el testículo (Hikim et al., 1988). Así, es conocido que, durante su época no reproductora, en otoño-invierno (fotoperiodo corto), ocurre el proceso de la regresión testicular por el cual estos animales pierden la capacidad reproductora. Por el contrario, en primaveraverano, en la época reproductora (fotoperiodo largo), estos animales recuperan su capacidad reproductiva previa mediante un proceso conocido como recrudescencia. Ambos procesos están regulados por el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal siendo el fotoperiodo el factor que sincroniza ambas etapas reproductoras con su medio ambiente (Young y Nelson, 2001). A nivel hormonal, durante el proceso de regresión (fotoperiodo corto), el aumento en la secreción de la melatonina, el cual está relacionado directamente con el incremento en número de horas de oscuridad, provoca la disminución en la secreción de las hormonas pituitarias. Esto último ocurre a través de la inhibición en la secreción de la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH), que a su vez ocasiona la disminución de la FSH, la hormona luteinizante (LH) y la prolactina, provocando finalmente un descenso en la concentración de la testosterona testicular (Berndtson y Desjardins, 1974; Bronson, 1999; Kelly et al., 1994; Young et al., 2001). Como consecuencia de todas estas alteraciones hormonales, el testículo se atrofia y disminuve en peso y volumen, (Berdtson y Desjardins, 1974).

En cuanto a la recrudescencia, esta se produce cuando disminuye la secreción de melatonina por el aumento de horas de luz (fotoperiodo largo), lo cual permite que se restablezcan los niveles hormonales de la FSH, LH y prolactina. Fruto de esto, se vuelve gradualmente a la concentración de testosterona intratesticular habitual de la época reproductora y, en consecuencia, se restablece la fertilidad. Aunque de manera natural en estos animales, la recrudescencia ocurre con el cambio de estación (y por tanto de fotoperiodo), en condiciones experimentales, mantenidos en un fotoperiodo corto continuo y una vez alcanzado el máximo grado de regresión, el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal de estos animales se vuelve refractario al fotoperiodo corto y deja de responder

a la secreción de melatonina. En consecuencia, se restablecen los niveles hormonales de FSH, LH, prolactina y testosterona comenzando de forma espontánea el proceso de recrudescencia sin que haya un cambio en el fotoperiodo (Turek et al., 1975). A su vez, estos estados de regresión y recrudescencia vinculados a la reproducción estacional del hámster sirio tienen su reflejo en cambios que ocurren a nivel celular en el testículo, tanto en el epitelio seminífero como en el intersticio (Lincoln, 1981).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito que en la involución del epitelio seminífero que sucede durante la regresión testicular debida a la exposición por fotoperiodo corto hay un incremento de la apoptosis de las células germinales junto con una disminución significativa en la proliferación de las espermatogonias (Seco-Rovira et al., 2015). Además, estos cambios celulares en el epitelio seminífero causan otros de carácter histomorfométrico. Así, se ha observado la disminución progresiva durante el proceso de regresión del volumen testicular, volumen tubular y volumen epitelial, a diferencia de la longitud tubular, que disminuye rápidamente al final del proceso (Seco-Rovira et al., 2015). También el análisis histológico de los túbulos seminíferos muestra un aumento progresivo en la proporción de secciones tubulares en parada a nivel de espermatocito junto con una ausencia total de secciones tubulares normales (espermatogénesis completa) (Seco-Rovira et al., 2015). Como se ha descrito al inicio de la introducción, los cambios en el epitelio seminífero que acontecen en los animales con reproducción estacional para alcanzar la infertilidad pueden ser de diferentes tipos. En el caso del hámster sirio se encuadrarían conceptualmente dentro de aquellas especies que hemos indicado antes en segundo lugar.

En cuanto al periodo de la recrudescencia, son escasos los datos tisulares acerca de cómo ocurre la recuperación del epitelio seminífero y, en consecuencia, cómo se restablece la fertilidad tanto en el hámster como en otras especies de mamíferos. Así, se ha observado una correlación entre recuperación de la espermatogénesis y el aumento de células **PCNA** (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) positivas coincidente también con el restablecimiento de los niveles de FSH durante la recrudescencia del hámster sirio, aunque se desconocen los datos cuantitativos del proceso (Jin et al., 2002). En cuanto a la apoptosis, se ha descrito que tras la hibernación y con bajas temperaturas éstas últimas provocan que la recrudescencia se retrase debido a un aumento en la apoptosis de las células germinales, sin alterarse la proliferación de las espermatogonias (Sato et al., 2005). Complementariamente, en el ratón de pies blancos se ha observado una

disminución de la actividad apoptótica que precede a la recrudescencia gonadal (Young y Nelson, 2001).

En cuanto al patrón histoquímico de lectinas en el epitelio seminífero del hámster sirio, nuestro grupo observó hace años cambios en él, entre los animales sujetos a regresión y los animales control (Pastor et al., 2003, Seco-Rovira et al., 2013). También como se ha indicado anteriormente, nuestro grupo ha demostrado la utilidad de la histoquímica de lectinas para detectar células germinales en apoptosis en el epitelio seminífero en hámster sirio durante la regresión testicular debida a fotoperiodo (Seco-Rovira et al., 2013, Seco-Rovira et al., 2017). Así, en ella, se ha observado que las células germinales en apoptosis incrementan la expresión de residuos de  $\beta$ - D –galactosa,  $\alpha$ - D – manosa y en algunos casos, de L –fucosa, (Seco-Rovira et al., 2013). Además, alguna lectina como la PNA (*Arachis hipogea*) detectó células de Sertoli con características morfológicas típicas de una célula en apoptosis.

Por último, y dentro del estudio de nuestro grupo de investigación sobre la regresión del epitelio seminífero en el hámster sirio tras un fotoperiodo corto, ha sido posible observar la apoptosis de células de Sertoli tanto con microscopia de luz como electrónica. También se ha calculado el índice de apoptosis para ésta célula durante todo el proceso de la regresión, siendo más fuerte la actividad apoptótica en sus fases iniciales (Seco-Rovira et al., 2014). Junto a ello, se ha podido constatar un fenómeno de fagocitosis de espermátidas alargadas por parte de las células de Sertoli, el cual coopera en la involución del epitelio durante la regresión. En este estudio, no fue cuantificada la población de células de Sertoli y no se pudo evaluar la disminución total de esta célula durante la regresión testicular. Respecto a esto, en un clásico estudio del hámster sirio (Sinha-Hikim et al., 1988), no se observó disminución en el número total de células de Sertoli en la regresión, contrariamente a lo que como hemos dicho antes sí sucedía en el hámster ruso (Meachem et al., 2005).

De todo lo comentado se pueden extraer algunas conclusiones sobre cuál es el estado en que se encuentra el estudio celular del epitelio seminífero del hámster sirio durante la reproducción estacional: A) Conocemos ya el papel de los fenómenos de proliferación y apoptosis en el epitelio seminífero durante la regresión testicular como factores importantes implicados en la depleción del epitelio y como esto se manifiesta en modificaciones que sufre el testículo y su estructura. En cambio, desconocemos como los fenómenos de proliferación y apoptosis en este roedor se comportan en la recrudescencia y como se recupera la estructura del testículo. En concreto, si ésta ocurre de forma

sincrónica en los dos compartimentos (túbulos seminíferos e intersticio testicular) o si, por lo contrario, es un proceso de recuperación en distintas fases; B) Respecto a la histoquímica de lectinas, ésta ha sido útil para observar variaciones de glucoconjugados durante la regresión en el epitelio seminífero, siendo además una técnica histoquímica que permite detectar la apoptosis de células germinales en ese epitelio. En la etapa de la recrudescencia no tenemos una caracterización de los glucoconjugados a lo largo de ella y por lo tanto no sabemos si existe cambios en ellos respecto a los observados durante la regresión o los observados en testículos complemente activos; C) En relación con la célula de Sertoli sabemos que durante la regresión testicular sufre apoptosis, pero desconocemos si el número total de estas células disminuye al final del proceso. Es más, desconocemos si en este proceso de regresión, la posible proliferación de las células de Sertoli podría llegar a compensar la pérdida de éstas por apoptosis. Todo ello plantea dudas sobre lo que le sucede a la célula de Sertoli durante la recrudescencia en relación a los fenómenos de proliferación y apoptosis.

En consecuencia, en la presente tesis doctoral se aborda en cuatro trabajos los aspectos arriba comentados. En el primer artículo se estudian tanto la dinámica proliferación / apoptosis como los cambios histomorfométricos (apartado A) durante el proceso de recrudescencia testicular. En él, se muestra cómo y de qué manera se modifica la estructura histológica del testículo en la recrudescencia espontánea y cómo la proliferación y apoptosis influyen en la recuperación del epitelio seminífero tras la involución ocurrida durante la regresión testicular debida a fotoperiodo corto en el hámster sirio. El segundo artículo responde al apartado B, en él se evidencia la utilidad de la histoquímica de lectinas para la identificación de las pocas células germinales en apoptosis, así como se comprueba como gradualmente el epitelio seminífero va recuperando su característico patrón histoquímico de lectinas, que indica la recuperación de los glucoconjugados propios del epitelio en condiciones de fotoperiodo largo. Finalmente, el **capítulo de libro** y el **tercer artículo** aborda la cuestión planteada en el apartado "C". En el capítulo se pone a punto una técnica de inmunofluorescencia para poder detectar células de Sertoli en proliferación. Seguidamente en el tercer artículo se analiza tanto la actividad proliferativa como apoptótica de la célula de Sertoli durante la regresión, la recrudescencia y en condiciones de fotoperiodo largo. También se calcula los números totales de estas células proliferativas y apoptóticas. Por último, se determina los números totales de células de Sertoli de los testículos en las tres condiciones. Con estas determinaciones se alcanza a tener una visión completa de cómo se modifica la

población de esta célula en el adulto, tanto en condiciones fisiológicas normales de reproducción, como durante el periodo no reproductivo y en el periodo de recuperación de la función reproductiva, en el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*).

# 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es estudiar el proceso de la recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto en el hámster sirio, tanto histomorfométricamente como con respecto a los cambios de las actividades de la proliferación y apoptosis en las células germinales y de Sertoli que pueden tener lugar durante la recuperación del epitelio seminífero, con la finalidad de esclarecer las causas implicadas durante este proceso de recrudescencia testicular. Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1.- Realizar un estudio cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo tanto de los cambios histomorfométricos que ocurren durante el proceso de la recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto como en los fenómenos de proliferación y apoptosis de las células germinales, así como determinar la importancia relativa de éstos en la recuperación del epitelio seminífero (**Artículo 1**).

2.- Evaluar, utilizando una extensa batería de lectinas, los cambios en el patrón de los glucoconjugados del epitelio seminífero e intersticio testicular, así como analizar la apoptosis de las células germinales utilizando la capacidad de las lectinas para detectar "in situ" específicamente la apoptosis de las células germinales, durante la recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto (**Artículo 2**).
### **OBJETIVOS**

3.- Identificar cualitativamente las células de Sertoli en proliferación mediante el uso de microscopía confocal. Para ello, poner a punto en nuestro laboratorio una doble tinción inmunohistoquímica para la detección de filamentos de vimentina y **PCNA** (**Capítulo de libro**). Posteriormente determinar, por un lado, los cambios en la actividad proliferativa y apoptótica de la célula de Sertoli durante la regresión y recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto, comparando esos datos con animales mantenidos en fotoperiodo largo (Control). Por otro lado, determinar el número total de células de Sertoli por testículo, como también las que están en proliferación o en apoptosis, durante los procesos de regresión y recrudescencia espontánea tras exposición a fotoperiodo corto como en animales mantenidos en fotoperiodo largo (Control) (**Artículo 3**).

### **3.1-. MATERIAL Y MÉTODOS**

### Animales y muestras

Se utilizaron 53 hámsteres machos de 6 meses de edad sexualmente maduros (*Mesocricetus auratus*) mantenidos inicialmente con un fotoperiodo largo de 14:10 h luzoscuridad. De ellos, cinco machos de 6 meses de edad, sanos y sexualmente competentes se utilizaron como grupo de Control y se mantuvieron con el mismo fotoperiodo de 14:10 h de luz-oscuridad. Los otros 48 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, 12, 16, 19 y 21 semanas se sacrificaron los animales tratados junto con un animal control por sobredosis de CO<sub>2</sub> en una cámara cerrada y los testículos se extrajeron inmediatamente.

Una parte del testículo se fijó en methacarn, una solución formada por metanol, cloroformo y ácido acético en proporción 6:3:1 respectivamente, durante 8 h a temperatura ambiente antes de ser procesado e incluido en parafina. Una vez realizados los bloques, se hicieron secciones de 5µm de espesor utilizando un micrótomo Microm HM310 (MICROM International GMbH, Walldorf, Germany). Estas secciones se usaron en varias técnicas de microscopía de luz: 1) histoquímica de lectinas utilizadas en el reconocimiento del patrón de glucoconjugados a lo largo del proceso de la recrudescencia espontánea y su posible uso para detectar células germinales con apariencia apoptótica, 2) hematoxilina-eosina (H&E) utilizadas en los estudios semicuantitativos de los tipos de secciones tubulares y morfométricos testiculares, 3) técnicas inmunohistoquímicas utilizadas en la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en el estudio semicuantitativo y cuantitativo de la actividad proliferativa de espermatogonias y Sertoli, y para la detección de los filamentos intermedios de vimentina utilizadas en el estudio semicuantitativo y cuantitativo de la célula de Sertoli, 4) técnica histoquímica de TUNEL ("terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP in situ nick end labelling", marcaje in situ de ADN fragmentado) en el estudio semicuantitativo y cuantitativos de la muerte celular por apoptosis de células germinales y la célula de Sertoli.

La otra parte del testículo fue incluida y procesada para su estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (**MET**). Finalmente, se establecieron tres grupos de regresión testicular atendiendo a criterios como semana de sacrificio, secciones tubulares en parada de espermátida redonda, diámetro tubular y área media tubular de epitelio seminífero: Regresión Media (**MReg**), Regresión Fuerte (**SReg**) y Regresión Total (**TReg**) (Seco-Rovira et al., 2015); así como otros tres grupos de recrudescencia testicular atendiendo a criterios como semana de sacrificio; proporción de secciones tubulares con normal espermatogénesis, peso y volumen testicular Recrudescencia Inicial (**IR**), Recrudescencia Avanzada (**AR**) y Recrudescencia Total (**TR**).

### Ética biomédica

Este estudio se realizó de acuerdo con 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.

### Caracterización histológica del grado de recuperación del túbulo seminífero para los estudios cualitativos y semicuantitativos

El grado de regresión o recuperación del túbulo semiínfero se clasificó en cuatro categorías: a) Túbulo normal, cuando el epitelio seminífero contenía toda la serie de células germinales bien definidas (espermátidas, espermatocitos y espermatogonias); b) hipoespermatogénico, cuando se observó una reducción en el desarrollo de las espermátidas tardías con una disminución del espesor del epitelio seminífero; c) parada o aparente parada en espermátidas redondas, cuando el epitelio germinal se desarrolló hasta espermátidas redondas pero no se observaron espermátidas elongadas o tardías en la luz del túbulo seminífero; d) parada o aparente parada en espermátidas redondas. La clasificación de tipos de secciones tubulares anteriormente mencionada fue utilizada para los diversos estudios realizados en la presente tesis doctoral y coincide con la usada anteriormente en los estudios de regresión testicular (Seco-Rovira et al., 2015), salvo que las etapas morfológicas que definen el

epitelio seminífero son inversas. En un caso se relacionan con la involución del epitelio (regresión) y en otra con su recuperación (recrudescencia).

### Histoquímica de lectinas

Las muestras se desparafinaron en xileno, se rehidrataron en etanol (100, 96 y 70%) y en agua destilada. En el caso de las lectinas conjugadas con **HRP** (peroxidasa de rábano picante), las muestras se lavaron durante 5 minutos en TBS (solución salina tamponada con Tris, pH 7,4) seguido de una incubación en una solución de TBS que contenía 0,3% de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (PanReac AppliChem GMbH, Darmstadt, Germany) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Después de 3 lavados en TBS, las secciones se incubaron con las lectinas marcadas con **HRP** (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA) en una cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar en TBS, las secciones se sumergieron en TBS que contenía 0,025mg/mL del sustrato cromógeno 3,3 'diaminobencidina (**DAB** (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA)) y 0,015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para poner de manifiesto los sitios que contienen actividad peroxidasa. Las secciones se contrastaron con hematoxilina, fueron deshidratadas, aclaradas en xileno y montadas usando DPX (Prolabo®, Hermosilla, Sonora, México) como medio de montaje.

Para las lectinas conjugadas con digoxigenina (**DIG**) (Boehringer, Barcelona, España), al igual que en el caso anterior, las secciones fueron incubadas con una solución en TBS con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% para bloquear la actividad peroxidasa endógena de las muestras y a continuación fueron incubadas en TBS con 1% de BSA ((Albumina de suero bovino (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Montana, USA)) durante 10 min. La incubación con las lectinas conjugadas con **DIG** se realizó en una solución formada por 1% BSA, 0,05% Tween 20 (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y 0,05% Triton X-100 (Sigma Chemical, CO, St. Louis MO, USA) en TBS durante 90 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación, se enjuagaron las muestras en TBS y seguidamente se incubaron durante 1h con un anticuerpo anti-**DIG** conjugado con **HRP** (Boehringer, Barcelona, España) a una dilución de 0,6U/ml en TBS en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para revelar la actividad peroxidasa, las secciones se sumergieron en TBS que contenía 0,025mg/mL de **DAB** y 0,015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta obtener un precipitado de color marrón en la muestra. Posteriormente, las secciones se contrastaron con hematoxilina, fueron deshidratadas, enjuagadas en xileno y montadas con DPX. Finalmente, las muestras se estudiaron con el microscopio de luz Olympus BX-51 acoplado con una cámara digital Olympus DP-25 (Olympus, Tokio, Japan).

### Técnica histoquímica de TUNEL

El estudio de la apoptosis en las células germinales y somáticas se realizó de acuerdo con el protocolo del "kit de detección de apoptosis in situ Cardio TACS®" (reacción TUNEL, R&D Systems, Minneapolis, USA). Las muestras fueron desparafinadas en Oxileno, rehidratadas en etanol (100, 96 y 70%) y con agua libre de DNAsas. A continuación, se incubaron con proteinasa K (1 mg/ml) durante 20 minutos y posteriormente se lavaron en agua destilada libre de DNAsas dos veces durante 1 minuto. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con 5% de  $H_2O_2$  en metanol durante 5 minutos. Una vez lavadas las muestras en agua 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<sup>+2</sup> (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 (tampón fosfato salino) 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 en O-xileno y montadas con DPX, 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.

### Técnica inmunohistoquímica de PCNA

Las muestras se desparafinaron en xileno, se rehidrataron en etanol (100, 96 y 70%) y en agua destilada. Se inactivó la actividad peroxidasa endógena de las muestras mediante la incubación en PBS con 0,3% de  $H_2O_2$  a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo de ratón anti-**PCNA** (Biomeda, Foster City, CA, EE.UU.) a una dilución 1:200 en PBS/BSA 1% en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras se lavaron en

PBS y se incubaron con anticuerpo policional de conejo biotinilado anti IgG de ratón (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:200 en PBS/BSA 1% en cámara húmeda durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces en PBS, las muestras se incubaron con estreptavidina conjugada con **HRP** (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:300 en PBS/BSA 1% en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se lavaron tres veces en PBS y se incubaron con una solución de 0,025mg/mL **DAB** y  $H_2O_2$  al 0,015% para revelar la actividad de peroxidasa seguido de dos lavados con agua destilada. El contraste de las muestras se realizó utilizando hematoxilina durante 10 segundos. Finalmente, se deshidrataron en etanol (70, 96 y 100%), se enjuagaron en xileno y se montaron con DPX. Las muestras fueron estudiadas con el microscopio de luz Olympus BX-51.

### Técnica inmunohistoquímica de filamentos intermedios de vimentina utilizada para la detección de células de Sertoli apoptóticas

La célula de Sertoli es la única célula dentro del epitelio seminífero que expresa filamentos intermedios de vimentina (Aumüller et al., 1988), por lo que esta característica permite diferenciar claramente células de Sertoli TUNEL+ de otras células germinales TUNEL+. Las secciones utilizadas fueron las mismas que se empelaron para la técnica **TUNEL**, las cuales habían sido previamente escaneadas, por lo que era necesario retirar primero el cubreobjetos de cada sección. Para ello, las secciones estuvieron inmersas en xileno hasta que fue posible retirar el cubreobjetos de forma segura y con sumo cuidado de no destruir el tejido. Después, las secciones fueron rehidratadas en etanol (100, 96 y 70%) y agua destilada. No era necesario bloquear la peroxidasa endógena puesto que ya se había realizado previamente en la técnica TUNEL por lo que directamente se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-vimentina clon V9 (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:50 en PBS/BSA 0,1% en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces en PBS y se incubaron con anticuerpo policional de conejo biotinilado anti IgG de ratón (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución de 1:200 en PBS/BSA 0,1% durante 45 min en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces en PBS, las muestras se incubaron con estreptavidina conjugada con HRP (Dako, Glostrup, Denmark) durante 30 min en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces en PBS y se incubaron con una solución de 0,025mg/mL DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,015%

para revelar la actividad de peroxidasa seguido de dos lavados con agua destilada. El contraste de las muestras se realizó utilizando hematoxilina durante 10 segundos o con la solución de contraste "nuclear fast red" del kit de "detección de apoptosis *in situ* Cardio TACS<sup>®</sup>" previamente usado. Finalmente, las muestras se deshidrataron en etanol (70, 96 y 100%), se enjuagaron tres veces en xileno y se montaron con DPX. Las secciones fueron estudiadas con el microscopio de luz Olympus BX-51 acoplado con una cámara digital Olympus DP-25.

### Doble inmunohistoquímica de PCNA y filamentos intermedios de vimentina para la detección de células de Sertoli con actividad proliferativa (PCNA+/Vimentina+)

Las secciones se desparafinaron, se rehidrataron en etanol (100, 96 y 70%) y en agua destilada, posteriormente se lavaron en PBS y se bloquearon en una solución de PBS con glicina al 0,02 M (PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Germany) en cámara húmeda durante 20 minutos. Después, las muestras se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-vimentina clon V9 (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:50 en PBS/BSA al 0,1% en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las muestras se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 dirigido frente IgG de ratón (Molecular Probes, USA), en PBS/BSA al 0,1% a una dilución 1:200 durante 45 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente y siempre en oscuridad a partir de este paso. Las muestras se lavaron 3 veces en PBS y fueron incubadas con el anticuerpo primario de cabra anti-PCNA (sc-56, Santa Cruz Biotechnology) en PBS/BSA al 1% a una dilución 1:200 y en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las muestras se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de conejo biotinilado anti IgG de cabra en PBS/BSA al 0,1% a una dilución 1:200 durante 45 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Nuevamente, las muestras se lavaron en PBS y fueron incubadas con estreptavidina conjugada con fluoresceína Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes, USA) en PBS/BSA 0,1% a una dilución de 1:600 durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS durante 5 minutos y montadas en un medio de montaje para fluorescencia (Dako, North America) manteniéndose en oscuridad hasta su posterior

estudio con el microscopio confocal Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) (**Capítulo de libro**).

### **Estudio ultraestructural con MET**

Las muestras de 1mm<sup>3</sup> se fijaron durante 4h en glutaraldehido al 3,5% diluido en tampón cacodilato sódico 0,1 M. Después fueron lavadas en una solución de cacodilatosacarosa 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 (1µm de espesor) que fueron teñidos con azul de toluidina. Las secciones ultrafinas se cortaron utilizando un ultramicrotomo Reichert-Imy Ultracut (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. El estudio ultraestructural se realizó con un microscopio electrónico Philips Tecnai 12 (FEI Co., Eindhoven, Netherlands).

### Análisis estadístico

Para algunos estudios estadísticos, los datos fueron transformados logarítmicamente. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) 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 24 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA).

### **3.2-. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS**

<u>Objetivo 1</u>: Realizar un estudio cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo tanto de los cambios histomorfométricos que ocurren durante el proceso de la recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto como en los fenómenos de proliferación y apoptosis de las células germinales, así como determinar la importancia relativa de éstos en la recuperación del epitelio seminífero (**Artículo 1**).

### Diseño experimental

### Determinación de los grupos de recrudescencia, estudio histológico cualitativo y semicuantitativo

Los grupos de recrudescencia se establecieron atendiendo a varios criterios como la exposición a fotoperiodo corto (**IR**: 16 semanas, **AR**: 19 semanas; **TR**: 21 semanas), proporción de secciones tubulares con normal espermatogénesis (**IR**:  $0\% \pm 0$ ; **AR**: 14,3%  $\pm 2,6$ ; **TR**: 21,3%  $\pm 2,4$ ; Control: 44,8%  $\pm 3,4$ ), volumen testicular (**IR**:  $0,59 \pm 0,07$  mm<sup>3</sup>; **AR**: 1,44  $\pm 0,04$  mm<sup>3</sup>; **TR**: 1,73  $\pm 0,06$  mm<sup>3</sup>; Control: 2,06  $\pm 0,11$  mm<sup>3</sup>) (10<sup>3</sup>) y peso (**IR**:  $0,61 \pm 0,08$ ; **AR**: 1,49  $\pm 0,04$ ; **TR**: 1,79  $\pm 0,06$ ; Control: 2,1  $\pm 0,11$ ) (g).

La proporción de secciones tubulares anteriormente citado se obtuvo mediante el estudio semicuantitativo del grado de recuperación del epitelio seminífero. Para este estudio, se utilizaron tres secciones de 5  $\mu$ m de espesor teñidas con H&E de cada testículo elegidas al azar y se examinaron 25 secciones tubulares de cada una, también elegidas al azar. De este modo, se clasificó cada sección tubular según el grado de recuperación del epitelio seminífero (aparente parada en espermatocito, aparente parada en espermátida, en hipoespermatogénesis y secciones tubulares normales) para cada animal estudiado. En cuanto al diámetro tubular medio (**MTD**), fue calculado usando cuatro secciones de 5  $\mu$ m de espesor de cada testículo, con el objetivo 10x y elegidas aleatoriamente. Para cada sección, se estudiaron 25 secciones tubulares al azar, obteniendo la media de dos medidas hechas en forma de cruz para cada sección tubular con el microscopio Olympus BX-51 y el software de análisis Cell D Olympus de acuerdo con previos estudios (Seco-Rovira et al., 2015).

### Estudio histomorfométrico cuantitativo

En primer lugar, los testículos fueron extraídos y pesados inmediatamente después usando una balanza Mettler PS 360 (Mettler-Toledo, L'Hospitalet de Llobregat, Spain). El volumen testicular ( $V_T$ ) se calculó considerando la densidad del testículo fresco ( $\rho$ ) de 1,037g/cm3 (Hikim et al., 1988) y el peso testicular (Tw): (Vt= Tw /  $\rho$ ). Para el estudio histomorfométrico se utilizaron tres secciones de 5µm de espesor teñidas con hemtaoxilina-eosina. De cada sección, se estudiaron 25 secciones tubulares al azar con el microscopio Olympus BX-51 y el software de análisis Cell D Olympus utilizándose para el cálculo de las siguientes variables: (1) la densidad de volumen de túbulos seminíferos (VDsT), como la ratio entre la superficie de túbulos seminíferos/área de referencia  $(142.049,28 \ \mu m^2)$ ; (2) la densidad de volumen del intersticio testicular (**VD**<sub>TI</sub>), como la ratio de superficie intersticial/área de referencia (142.049,28 µm<sup>2</sup>); (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**<sub>ST</sub>/ $\pi$ R<sup>2</sup> (Wing y Christensen, 1982; Santamaría et al., 1995). Además, para la longitud total del túbulo seminífero (LsT), se asume que todos los túbulos forman un único cilindro de longitud L, radio R (MTD/2) y un volumen Vsr. Así, Lsr se calculó como Lv×Vr; (5) el área tubular total (TTA), como  $2\pi R \times L_{ST}$ ; (6) El volumen total de epitelio seminífero (VsE), como densidad de volumen de epitelio seminífero (ratio área epitelio seminífero/ área de referencia (142.049,28  $\mu$ m<sup>2</sup>)) multiplicado por V<sub>T</sub>; (7) el volumen de intersticio testicular (VTI), como densidad de volumen de intersticio testicular (ratio área de intersticio testicular/área de referencia (142.049,28  $\mu$ m<sup>2</sup>)) multiplicado por V<sub>T</sub> y (8) el volumen de luz tubular (VTL), como área del lumen tubular/área de referencia (142.049,28  $\mu$ m<sup>2</sup>) multiplicada por V<sub>T</sub>. Finalmente se calculó la ratio VD<sub>SE</sub> / VD<sub>TL</sub> y se realizó una correlación de Pearson entre todas las variables histomorfométricas estudiadas.

### Evaluación semicuantitativa del estudio inmunohistoquímico (PCNA) y del estudio histoquímico (TUNEL) de las células germinales

Para el estudio de la proliferación a lo largo del proceso de la recrudescencia espontánea se utilizó la técnica inmunohistoquímica de **PCNA** anteriormente descrita. Con esta técnica, se ponen de manifiesto células que se encuentran en fase G1/S o G2 del ciclo celular, en este caso, son las espermatogonias del epitelio seminífero las células con capacidad proliferativa. Así, para el recuento de las espermatogonias **PCNA** positivas, se calculó un índice de proliferación (**PI**); número de espermatogonias **PCNA** positivas x 100 / total de espermatogonias (positivas + negativas). Para ello, se utilizaron 4 secciones al azar y de cada sección, se estudiaron 25 campos al azar (tamaño de campo=0,0355mm<sup>2</sup>) con el objetivo de 40x utilizando el microscopio de luz Olympus BX-51 tal y como se ha realizado en estudios anteriores (Seco-Rovira et al., 2015).

El estudio de la actividad apoptótica del epitelio seminífero durante el proceso de la recrudescencia espontánea se realizó mediante la técnica histoquímica de **TUNEL**. Como en el caso anterior, se utilizaron 4 secciones al azar y de cada sección se estudiaron 25 campos (tamaño de campo=0,0355mm<sup>2</sup>), también al azar. De este modo, en cada campo se realizó el recuento *in situ* de los diversos tipos de células germinales en apoptosis obteniendo el número de espermatogonias, espermatocitos 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 los datos obtenidos, se calculó el índice de apoptosis (**AI**) para cada tipo celular como el número de células germinales **TUNEL** + x 100 / número total de cada tipo célula germinal (positiva + negativa). Así se calcularon los índices de apoptosis espermatogonias, espermatocitos y espermátidas redondas de acuerdo con estudios anteriores (Seco-Rovira et al., 2015).

Una vez obtenidos **PI** y **AI**, se estudió la relación existente entre ambos procesos durante recrudescencia espontánea tras la exposición a fotoperiodo corto. Así, se establecieron las siguientes razones: **AI** de espermatogonias / **PI** de espermatogonias, **AI** de espermatogonias + espermatocitos / **PI** de espermatogonias y **AI** de espermatogonias + espermatocitos + espermatogonias / **PI** de espermatogonias acorde con previos estudios (Seco-Rovira et al., 2015).

### Estudio cuantitativo de la actividad proliferativa y apoptótica de las células germinales

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: donde Nv = Na /(D + t - 2h) (Floderus, 1944, Morales et al., 2003, Seco-Rovira et al., 2015, Beltrán-Frutos et al., 2018). **Na** es el número de núcleos por unidad de área de testículo (mm<sup>2</sup>) (datos obtenidos del estudio semicuantitativo de la proliferación y 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 (5µm) y **h** es Dx0.1

El número de las espermatogonias proliferantes totales y el número total de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas redondas apoptóticas y no apoptóticas durante recrudescencia espontánea tras la exposición a fotoperiodo corto fueron obtenidos multiplicando **Vd** (obtenida con la ecuación de Floderus) x **Vt**.

### **Resultados**

Estudio histomorfométrico de la recrudescencia espontánea en el hámster sirio tras la exposición a fotoperiodo corto

### 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 recuperación del epitelio seminífero). Así, en los testículos del grupo Control (animales no sometidos a un fotoperiodo corto) se observaron mayoritariamente secciones tubulares normales, con la espermatogénesis completa, o secciones hipoespermatogénicas mostrando una luz más amplia. En el grupo **IR**, fueron predominantes las secciones tubulares en aparente parada de espermátidas redondas, sin observarse todavía secciones tubulares con espermatogénesis normal. En cuanto al grupo **AR**, se observó un abrupto incremento de las secciones hipoespermatogénicas a la vez que había una baja proporción de secciones tubulares normales y secciones tubulares en aparente parada de espermátida redonda. Finalmente, el grupo de **TR**, parecía un estado intermedio entre el grupo de **AR** y el grupo Control.

Semicuantitativamente, el grado de recuperación del epitelio seminífero en los grupos estudiados fue observado como un incremento significativo en el número de secciones tubulares normales entre **IR** (0%) y **TR** (21,3%) (p<0,05). Por otro lado, la proporción de secciones tubulares en aparente parada de espermatocito fue significativamente mayor en el **IR** que en el resto de los grupos estudiados, decreciendo a medida que progresa la recrudescencia, en concreto en el grupo **AR**, sin cambios significativos en los restantes grupos (**IR**: 21%; **AR**: 1.6%; **TR**: 1% y grupo Control 0%) (p<0,05). La proporción de secciones tubulares en aparente parada de espermátida redonda disminuyó significativamente a lo largo del proceso de la recrudescencia (**IR**: 68,1%; **AR**: 11.5% y **TR**: 5,5%) (p<0,05). Así, esta rápida disminución de secciones tubulares en aparente parada en espermátida redonda observada entre los grupos **IR** y **AR** fueron sustituidas por un incremento de las secciones tubulares en hipoespermatogénesis desde el grupo de **IR** a otros grupos más avanzados de recrudescencia (**IR**: 10,4%; **AR**: 71,1%; **TR**: 72,7% y grupo Control 54,4%) (p<0,05).

Finalmente, el parámetro semicuantitativo de diámetro tubular medio (**MTD**) fue significativamente menor en el grupo **IR** respecto al resto de grupos estudiados, sin cambios significativos entre ellos (**IR**: 178,9 ± 12,7 µm; **AR**: 244,6 ± 9,0 µm; **TR**: 272,6 ± 11,3 µm y grupo Control 283,6 ± 19,1 µm) (p<0,05).

#### Estudio histomorfométrico cuantitativo

Respecto al peso testicular, en todos los grupos estudiados se observó un incremento significativo, que a su vez estuvo acompañado por un incremento significativo de los parámetros  $V_T$ ,  $V_{ST}$  y  $V_{SE}$  (p<0,05) en los grupos de recrudescencia. Los parámetros  $V_{TL}$  y TTA, fueron significativamente menores en el grupo de IR respecto al resto de grupos (p<0,05), pero estos a su vez estuvieron siempre por debajo de los valores del grupo Control. L<sub>ST</sub> fue significativamente menor en el grupo de IR que el resto de los grupos, sin cambios significativos entre ellos (p<0,05). Finalmente, la ratio  $VD_{SE}$  /  $VD_{TL}$  fue solamente significativamente mayor en el grupo IR comparada con el resto de los grupos estudiados (p<0,05) (Esquema 1).

El estudio de correlaciones mostró que todas las variables estudiadas tuvieron correlación positiva con respecto al peso y volumen testicular (p<0,05). Además, Vsr se correlacionó positivamente con todas las variables estudiadas excepto para VTL. Por el

contrario, no se encontraron correlaciones entre el  $V_{TL}$  y  $V_{SE}$ , entre  $V_{TI}$  y **MTD.** Finalmente, se observó una correlación positiva entre  $L_{ST}$  y  $V_{TI}$ , pero no hubo ninguna entre  $L_{ST}$  and **MTD**.



Esquema 1. Representación de los cambios morfométricos que tienen lugar en el testículo del hámster sirio durante la recrudescencia espontánea tras la exposición a fotoperiodo corto. A) Representación de una sección transversal de un túbulo seminífero donde se muestran el epitelio seminífero (negro) y la luz tubular (blanco) y B) Representación esquemática de una sección longitudinal del testículo mostrando las variaciones observadas tanto en el túbulo seminífero como en intersticio testicular en los distintos grupos de recrudescencia espontánea. S.E: Sin cambios estadísticos significativos; V<sub>T</sub>: Volumen testicular; V<sub>ST</sub>: Volumen del túbulo seminífero; V<sub>SE</sub>: Volumen del epitelio seminífero; MTD: diámetro medio tubular; TTA: Área tubular total.

### Proliferación y apoptosis en el epitelio seminífero durante el proceso de recrudescencia espontánea tras un fotoperiodo corto

### Estudio semicuantitativo de la proliferación y la apoptosis

La identificación de las espermatogonias proliferantes 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. 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. 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 mayor en los tres grupos de recrudescencia respecto al grupo Control (p<0,05), sin diferencias significativas entre ellos (**Gráfico 1**).



**Gráfico 1**. Índice de proliferación para las espermatogonias en cada grupo de estudio. <sup>a, b</sup> indican diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio (p<0,05). **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.

En relación con la muerte por apoptosis, los índices de apoptosis (**AI**) para cada tipo de célula germinal estudiado volvieron a valores similares al grupo Control progresivamente. Así, **AI** de espermatogonias fue significativamente mayor en el grupo **IR** que en los grupos **TR** y el grupo Control (p<0,05). En cuanto al **AI** de espermatocitos y espermátidas redondas, fueron significativamente mayores en el grupo **IR** comparado con el resto de los grupos (p<0,05). Los **AI** de espermatogonia + espermatocitos y espermatogonia + espermatocitos + espermátidas redondas fueron significativamente mayores en **IR** que en el resto de los grupos estudiados (p<0,05) disminuyendo rápidamente estos valores en el grupo de **AR** (**Gráfico 2**).



**Gráfico 2**. Índices de apoptosis de las diferentes células germinales en cada grupo de estudio. <sup>a, b, a', b',</sup>  $a^{*, b^{*}, A, B, \alpha, \beta}$  indican diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio (p<0,05). **AI**: Índice de apoptosis; **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.

Con los resultados de proliferación y apoptosis obtenidos anteriormente, se estudió la relación entre ambos fenómenos durante el proceso de recrudescencia testicular. Así, se observó que las ratios **AI** de espermatogonias / **PI** de espermatogonias y **AI** de espermatocitos / **PI** de espermatogonias fueron significativamente mayores en el grupo de **IR** que en los grupos **TR** y el grupo Control (p<0,05). En el caso de la ratio **AI** de

espermátidas redondas / **PI** espermatogonias fue significativamente mayor en el grupo **IR** que el resto de los grupos (p<0,05). Las ratios **AI** de espermatogonias + espermatocitos / **PI** de espermatogonias y **AI** espermatogonias + espermatocitos + espermátidas redondas (Total) / **PI** de espermatogonias fueron significativamente mayores en el grupo **IR** respecto al resto de grupos (p<0,05) (**Gráfico 3**).



**Gráfico 3**. Ratio entre los índices de apoptosis de las células germinales y el índice de proliferación de espermatogonias para cada grupo de estudio. <sup>a, b, a', b', a\*, b\*, A, B,  $\alpha$ ,  $\beta$  indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **AI**: Índice de apoptosis; **PI**: Índice de proliferación (de espermatogonias); **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.</sup>

## Estudio cuantitativo: número total de células germinales, número total de espermatogonias con actividad proliferativa y número total de células germinales con actividad apoptótica

En cuanto al número total de espermatogonias y espermatocitos, este se incrementó significativamente desde el grupo **IR** al grupo **AR**, alcanzando valores similares al grupo Control (p<0,05). El número total de espermátidas redondas fue significativamente menor en el grupo de **IR** respecto al resto de grupos (p<0,05), pero en ningún caso (grupo) alcanzó los valores similares al grupo Control. El número total de células germinales por testículo fue significativamente menor en el grupo **IR** respecto a los otros grupos (p<0,05), sin cambios significativos entre ellos (**Gráfico 4**).



**Gráfico 4.** Número total de células germinales por testículo. <sup>a, b, a', b', a\*, b\*, c\*, A, B</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.

Respecto al número de espermatogonias proliferativas, fue significativamente menor en el grupo de **IR** comparado con el resto de los grupos (p<0,05) (**Gráfico 5**).



**Gráfico 5**. Número total de espermatogonias en proliferación por testículo. <sup>a, b</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.

Por el contrario, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos de estudio respecto el número total tanto de espermatogonias como del número total espermátidas redondas en apoptosis. El número total de espermatocitos en apoptosis fue significativamente mayor en los grupos **IR** y **AR** respecto a los grupos **TR** y Control (p<0,05). Finalmente, el número total de espermatogonias + espermatocitos, así como el número total de células germinales apoptóticas (espermatogonias + espermatocitos + espermátidas redondas) fue significativamente mayor en los grupos **IR** y **AR** respecto a los grupos **IR** y **AR** respecto a los grupos **IR** y **AR** respecto a los grupos **IR** y **Control** (p<0,05).



**Gráfico 6.** Número total de células germinales en apoptosis por testículo. <sup>a</sup>,<sup>b</sup>, A, B,  $\alpha$ ,  $\beta$  indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**; Recrudescencia Total.

### Estudio con MET

La apoptosis de los diferentes tipos de células germinales durante la recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto, observada con microscopia de campo claro mediante la técnica histoquímica **TUNEL**, fue confirmada con la microscopia electrónica de transmisión. Así, durante la temprana recrudescencia (**IR**), fueron observados tanto espermatocitos como espermátidas redondas en apoptosis en la posición medial y próxima al lumen, respectivamente. Además, se observó la pérdida completa de adhesión con las células vecinas, condensación de la cromatina y degeneración del citoplasma como características típicas de la muerte celular programada. Finalmente, se observó tanto espermatogonias en división (metafase y anafase) así como anormalidades en el proceso de la espermiogénesis, especialmente al inicio de la recrudescencia (**IR**).

<u>**Objetivo 2**</u>: Evaluar, utilizando una extensa batería de lectinas, los cambios en el patrón de los glucoconjugados del epitelio seminífero e intersticio testicular, así como analizar la apoptosis de las células germinales utilizando la capacidad de las lectinas para detectar "in situ" específicamente la apoptosis de las células germinales, durante la recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto (**Artículo 2**).

### **Diseño experimental**

Para la realización del siguiente experimento se tuvieron en cuenta los grupos de recrudescencia espontánea tras un fotoperiodo corto establecidos anteriormente (**Artículo** 1). Las lectinas PNA, SBA, HPA, LTA, Con-A, UEA-I, WGA y DBA estaban conjugadas con **HRP** mientras que las lectinas MAA, GNA, AAA y SNA estaban conjugada con **DIG**. Los nombres comunes, especificidad de azúcares y concentraciones utilizadas de las lectinas se muestran en la **Tabla 1**.

Taxonomic name	Acronym	Concentration	Specificity	Inhibitory sugar
Galanthus nivalis	GNA	10 µm/ml	Man α1,3-Man-	Methyl -α-Man
Canavalia ensiformis	Con-A	$15 \ \mu m/ml$	$\alpha$ -D-Man > $\alpha$ -D-Glc	Methyl-α-Man
Glycine max	SBA	$12 \ \mu m/ml$	$\alpha$ -D-GalNAc > $\beta$ -D-Gal	NAc D-Gal NAc
Helix pomatia	HPA	$12 \ \mu m/ml$	α-D-GalNAc α1,3-Gal	NAc D-Gal NAc
Triticum vulgaris	WGA	6 μm/ml	Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc $\beta$ 1 > GlcNAc $\beta$ 1 > Neu5Ac	D-Glc NAc (0,7 M)
Arachis hypogea	PNA	$12 \ \mu m/ml$	Gal β1,3-GalNAcα1	β-D-Gal (0,4 M)
Ulex europaeus	UEA-I	25 µm/ml	L- Fuc α1,2-Gal β1,4-GlcNAc β1-	L-Fuc
Aleuria aurantia	AAA	$15 \ \mu m/ml$	L-Fuc a1-6-	L-Fuc
Lotus tetragonolobus	LTA	25 µm/ml	α-L-Fuc	L-Fuc
Maackia amurensis	MAA	15 µm/ml	Neu5Ac α2,3-Gal β1,4-GlcNAc β1	Neuraminic acid, lactose
Sambucus nigra	SNA	15 µm/ml	Neu5Ac α2,6-Gal/Gal NAc	Neuraminic acid, lactose

**Tabla 1**: Nombre taxonómico, acrónimo, concentración, especificidad y azúcares inhibitorios de las lectinas utilizadas en el presente estudio. Abreviaciones: Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetil-galactosamina; Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetil-glucosamina; Man, manosa; Methyl-α-Man, metil alfa manosa; Neu5Ac, Ácido Neuramínico.

La afinidad específica de las lectinas se comprobó realizando los siguientes controles: (1) Preabsorción de las lectinas con sus correspondientes azúcares inhibitorios a una concentración de 0,2M (excepto para aquellos que requerían una concentración diferente especificado en la **Tabla 1**); y (2) substitución 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 elegidas al azar de cada animal. De cada una de ellas, se escogieron 25 campos al azar donde se observaron las secciones tubulares totales o parciales. De este modo, la intensidad de tinción fue evaluada por dos observadores independientes y clasificada en cuatro categorías: +++, afinidad muy fuerte, ++, afinidad fuerte, +, afinidad moderada y – ausencia de afinidad, tal y como se ha realizado en anteriores trabajos cualitativos de histoquímica de lectinas (Calvo et al., 2000, Parillo et al., 2012). Las imágenes fueron captadas con una cámara digital Olympus DP-25 conectada al microscopio de luz Olympus BX-51.

### **Resultados**

#### Cambios en el patrón de glucoconjugados durante la recrudescencia espontánea

En los animales control, aquellos sometidos a fotoperiodo largo, el patrón de afinidad de las lectinas, tanto en el epitelio seminífero como en el intersticio testicular fue similar al encontrado en estudios anteriores (Pastor et al., 2003).

En la recrudescencia, el Golgi de las espermátidas en fase Golgi, mostró un incremento en su afinidad para la lectina LTA alcanzando en el grupo de **TR** una intensidad similar a la encontrada en los animales control. El acrosoma de las espermátidas en fase "cap" mostró un incremento en su afinidad para la lectina Con-A, observándose un marcaje similar al del grupo Control en el grupo **TR**. En cuanto al acrosoma de las espermátidas en fase de acrosoma, se observó un incremento en la afinidad tanto para la lectina PNA como Con-A, alcanzando en el grupo de **TR** una intensidad similar a la del grupo Control (**Tabla 2**).

Respecto a los espermatocitos, mostraron una disminución en la afinidad tanto para la lectina PNA como AAA durante el proceso de recrudescencia espontánea, mientras que para las lectinas LTA y GNA, se observó un aumento de la afinidad a lo largo del proceso, siendo la positividad similar en **TR** al patrón observado en los animales Control (**Tabla 2**).

Las espermatogonias, en su mayoría las de tipo B, mostraron un incremento en la afinidad para la lectina Con-A mientras que la afinidad para la lectina WGA disminuyó ligeramente a lo largo del proceso de recrudescencia. Finalmente, se observó una

disminución de la positividad para la lectina AAA mostrando las espermatogonias un patrón similar en **TR** al del grupo Control (**Tabla 2**).

Las células de Sertoli mostraron una disminución de la positividad a GNA durante la recrudescencia. En cuanto a las células de Leydig, se observó un aumento en la intensidad para la lectina Con-A, mientras que la intensidad para GNA fue muy fuerte en el grupo **IR** disminuyendo en el grupo **TR**, en el cual se detectó un marcaje similar al grupo Control. Finalmente, no se observaron cambios en el patrón de glucoconjugados de la lámina propia durante el proceso de recrudescencia espontánea comparada con el grupo Control.

Cell Type	Lectin	IR	AR	TR	Control	Phase
Spermatids	LTA	-	+	++	++	Golgi
	Con-A	+	+/++	++	++	Cap
	PNA	+	++	+++	+++	Acrosomal
	Con-A	+	++	+++	+++	
Spermatocytes	AAA	++	+	-	-	
	PNA	++	+	-	-	
	LTA	+	++	+++	+++	
	GNA	-	+	++	++	
Spermatogonia	Con-A	+	++	+++	+++	
	WGA	+	+	-	-	
	AAA	+++	++	+	+	
Sertoli cells	GNA	+++	++	+	+	
Leydig cells	Con-A	+	++	+++	+++	
	GNA	+++	+++	++	++	

**Tabla 2**: Resumen de los resultados observados para el cambio en el patrón de glucoconjugados a lo largo del proceso de la recrudescencia espontánea. +++: afinidad muy fuerte; ++: afinidad fuerte; +: afinidad moderada; +/++: afinidad moderada con algún caso fuerte; -: ausencia de afinidad. El resto de lectinas mostraron patrones de afinidad similares a los controles durante la recrudescencia.

### Uso de lectinas para detectar la apoptosis en el proceso de la recrudescencia espontánea

Entre las lectinas utilizadas para caracterizar el patrón de glucoconjugados a través del proceso de la recrudescencia, algunas de ellas como la PNA, GNA, AAA, LTA y Con-A mostraron positividad por células que tenían una morfología característica de célula apoptótica (cromatina condensada, fragmentación nuclear o separación del resto de células vecinas).

El marcaje con la lectina PNA fue muy fuerte en el citoplasma de las espermátidas redondas, observándose principalmente en el grupo de **IR**. Además, en este grupo, se observaron secciones tubulares con gran cantidad de espermátidas redondas (debido a que la mayoría de secciones en **IR** estaban en real o aparente parada de espermátida redonda) muy positivas a PNA mientras otras secciones similares adyacentes mostraron un marcaje inexistente o débil para esta lectina. En otros estados más avanzados de la recrudescencia (**AR**, **TR**), esta positividad se observó de forma aislada y similar a los controles.

La lectina GNA ocasionalmente presentó una positividad fuerte en el citoplasma de las espermátidas redondas que presentaban características de células apoptóticas, respecto a otras células que presentaban una morfología normal durante la fase inicial de la recrudescencia (**IR**), pero casi no se observó en el grupo **TR**. Los espermatocitos mostraron una fuerte afinidad por la lectina GNA cuando estos presentaban características morfológicas en avanzado estado de apoptosis, hecho que fue observado rara vez en los grupos de **AR** y **TR**.

Con la lectina AAA, se marcó el citoplasma de las espermátidas redondas tanto en fases iniciales como tardías de la apoptosis, especialmente en el grupo de **IR**. En los espermatocitos, se observó un incremento en la positividad del citoplasma para lectina AAA desde las fases iniciales de la apoptosis a otras más avanzadas del proceso, pero no en las fases tardías de la muerte celular programada. Esta positividad se observó ocasionalmente en los grupos de **AR** y **TR** en comparación con el inicio de la recrudescencia (**IR**).

Para la lectina Con-A, las espermátidas redondas alteradas mostraron más positividad en su citoplasma que las otras células normales, observándose esta afinidad en las primeras etapas de la apoptosis y en el grupo de **IR** principalmente. Por otro lado, los

espermatocitos con típicas características apoptóticas mostraron fuerte marcaje por esta lectina en su citoplasma, aunque en estados más avanzados de apoptosis, esta afinidad se observó también a nivel nuclear. Este hecho fue observado esporádicamente en los tres grupos de recrudescencia. Finalmente, la lectina LTA mostró una fuerte positividad en los espermatocitos que se encontraban tanto en las etapas iniciales y tardías de la apoptosis, aunque la frecuencia de este hecho disminuyó a lo largo de la recrudescencia hasta ser prácticamente inexistente en el grupo **TR**.

**Objetivo 3**: Identificar cualitativamente las células de Sertoli en proliferación mediante el uso de microscopía confocal. Para ello, poner a punto en nuestro laboratorio una doble tinción inmunohistoquímica para la detección de filamentos de vimentina y **PCNA (Capítulo de libro)**. Posteriormente determinar, por un lado, los cambios en la actividad proliferativa y apoptótica de la célula de Sertoli durante la regresión y recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto, comparando esos datos con animales mantenidos en fotoperiodo largo (Control). Por otro lado, determinar el número total de células de Sertoli por testículo, como también las que están en proliferación o en apoptosis, durante los procesos de regresión y recrudescencia espontánea tras exposición a fotoperiodo corto como en animales mantenidos en fotoperiodo largo (Control) (**Artículo 3**).

### Diseño experimental

### Detección de células de Sertoli en apoptosis (TUNEL +/Vimentina+)

Se utilizaron las mismas secciones empleadas en la evaluación de la apoptosis del epitelio seminífero (**Articulo 1**, estudio semicuantitativo de la técnica histoquímica **TUNEL**), las cuales previamente habían sido digitalizadas con el escáner de secciones de microscopía SCN400F (Leica Biosystems). Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en un servidor local utilizando el software Slide Digital Hub (Leica Biosystems). De este modo, si en el posterior muestreo aleatorio realizado en estas secciones digitalizadas se observaba una célula **TUNEL** + con morfología de célula de Sertoli se podía confirmar este hecho con una segunda tinción. La concreta sección se reincubó con el anticuerpo para la detección de filamentos intermedios de vimentina, como previamente se ha descrito (**Material y Métodos**), verificando si la supuesta célula en apoptosis era una célula de Sertoli. Para ello, se localizaba el mismo campo tanto en la sección digitalizada como en la sección inmunoteñida para vimentina y se capturaban las imágenes de ellos. Para las de **TUNEL** con el software Slide Digital Hub y para las de vimentina con el microscopio Olympus BX-51 y su cámara acoplada Olympus DP-25. Las imágenes se superponían y se confirmaba si la célula **TUNEL** + era o no era la de Sertoli.

### Estudio semicuantitativo: indices de apoptosis y proliferación de la célula de Sertoli.

Para determinar la actividad apoptótica de las células de Sertoli en los diferentes grupos de recrudescencia testicular, se realizó un estudio semicuantitativo para obtener un índice de células de Sertoli TUNEL+ (AScI). Para ello, se utilizó 4 secciones de TUNEL escaneadas y se cogieron 20 campos al azar en cada una de ellas. 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, con las secciones teñidas con vimentina, se confirmó si todas las células TUNEL+ con morfología similar a células de Sertoli realmente eran o no células de Sertoli en proceso de apoptosis. Para los grupos de regresión se tenía ya calculado el AScI por un anterior estudio (Seco-Rovira, et al. 2014)

En cuanto a la actividad proliferativa de la célula de Sertoli fue calculado como un índice de proliferación (**PScI**): número de células de Sertoli **PCNA**+/Vimentina+ / número total de células de Sertoli x100. Para este cálculo, se utilizaron 3 secciones por animal escogidas al azar, contando en cada sección al menos 1000 células de Sertoli de campos obtenidos al azar y con el objetivo de 20x. Finalmente, con los datos obtenidos previamente de apoptosis y proliferación, se calculó la ratio entre ambos fenómenos (**AScI / PScI**) para todos los grupos de estudio.

# Estudio cuantitativo: número total de células de Sertoli, número total de células de Sertoli proliferativas, apoptóticas y ratio de células germinales por célula de Sertoli.

Una vez identificada la célula de Sertoli en el epitelio seminífero con la inmunohistoquímica de filamentos intermedios de vimentina en el estudio semicuantitativo, estas secciones se utilizaron para calcular la fracción de volumen nuclear de células de Sertoli (**NVSc**) mediante un método de recuento por puntos (Meachem et al., 1996, Guan et al., 2014). Para ello, se utilizó el objetivo de 40x, trazando una matriz de 35 puntos donde cada punto tenía asociado un área de referencia de 100  $\mu$ m<sup>2</sup> y contado los puntos de la matriz que tocaban el núcleo de una célula de Sertoli. De este modo, se obtuvo la fracción **NVSc**, definida como la ratio entre el número de puntos

de la matriz que tocaban el núcleo de una célula de Sertoli divido entre el número total de puntos de la matriz (35 puntos). La fracción **NVSc** obtenida se multiplicó por el volumen testicular, calculado anteriormente en otros trabajos de los mismos animales utilizados en este estudio (Seco-Rovira et al., 2015, **Artículo 1**), obteniendo de este modo el volumen nuclear total de células de Sertoli por testículo (**TNVSc**) (cm<sup>3</sup>).

Por otro lado, se calculó el volumen nuclear promedio de una célula de Sertoli (**aNVSc**) (cm<sup>3</sup>/Sc) para cada grupo establecido, asumiendo que el núcleo de una célula de Sertoli es una esfera prolada y cuyo volumen está determinado por;  $Volumen = \frac{4}{3}\pi ab^2$  donde a= es el radio más largo y b= es el radio más corto, utilizando el microscopio de luz Olympus BX-51 y el software Cell D Olympus y midiendo hasta que el error de cada radio fuera menor al 10% (McCoard et al., 2001, Guan et al., 2014). Los datos obtenidos respecto al aNVSc fueron corregidos por el factor de retracción del fijador methacarn (1,2) determinado en anteriores trabajos (Morales et al., 2004) y por el factor de corrección de Abercrombie (4/  $\pi$ ) (Abercrombie, 1946). Con los datos anteriormente obtenidos, se calculó el número total de células de Sertoli por testículo

(**TnSc**) para cada grupo de estudio: TnSc = TNVSc / aNVSc.

Con los datos obtenidos previamente en el estudio semicuantitativo y los previamente obtenidos para el grupo de regresión (Seco-Rovira et al. 2014) se pudo calcular el número total de células Sertoli apoptóticas y proliferativas. Así, el número total de células de Sertoli apoptóticas fue calculado multiplicando el **AScI** por el número total de células de Sertoli (**TnSc**) y dividido por 100. Del mismo modo fue calculado el número total de células de Sertoli con capacidad de proliferación, multiplicando el **PScI** por **TnSc** y dividido por 100. Finalmente, con los datos obtenidos en un anterior trabajo para los grupos de regresión (Seco-Rovira et al, 2015) y los obtenidos del estudio cuantitativo (**Artículo 1**) en relación al número total de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas redondas, se pudo calcular las siguientes ratios: número total de espermatocitos / número total de células de Sertoli y el número total de espermátidas redondas / número total de células de Sertoli.

### **Resultados**

#### Estudio cualitativo

La técnica histoquímica **TUNEL** seguida de la inmunohitoquímica para detección de filamentos de vimentina permitió identificar la presencia de células de Sertoli en apoptosis en todos los grupos de estudio, principalmente localizadas en la zona basal del epitelio en todo tipo de secciones tubulares (secciones tubulares en aparente parada de espermatocitos o de espermátidas, secciones tubulares hipoespermatogénicas o secciones tubulares normales). Así mismo, con la doble inmunohistoquímica para **PCNA** y filamentos de vimentina, mediante microscopía confocal, se pudo observar algunas células de Sertoli con capacidad de proliferación (**PCNA**+/Vimentina+) de forma dispersa en todos los tipos de secciones tubulares sin que se pudieran asociar su frecuencia con ningún tipo concreto de sección tubular. Este hecho se observó en todos los grupos de estudio.

### Estudio semicuantitativo

Respecto a la actividad apoptótica de la célula de Sertoli se observó un incremento significativo en el grupo **MRg** y **SRg** comparado con los otros grupos de estudio. No se encontraron cambios significativos entre **TRg**, **IR**, **AR**, **TR** y el grupo Control (p < 0,05) (**Gráfico 7**). En cuanto a la actividad proliferativa, fue significativamente mayor en **SRg**, **TRg**, **IR** y **AR** respecto al grupo Control, sin cambios significativos entre **MRg**, **TR** y el grupo Control (p < 0,05) (**Gráfico 8**). Finalmente, el estudio de la ratio apoptosis / proliferación de la célula de Sertoli mostró un aumento significativo en **MRg** respecto a otros grupos. En los grupos **TRg**, **IR** y **AR** se observó una disminución significativa con respecto al grupo Control. No se hallaron cambios significativos entre **SRg** y el grupo Control (p < 0,05) (**Gráfico 9**).



**Gráfico 7**. Índice de apoptosis de la célula de Sertoli a lo largo del proceso de regresión, recrudescencia espontánea tras la exposición a fotoperiodo corto y animales control (fotoperiodo largo). <sup>a, b, c</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **MReg**: Regresión Media; **SReg**: Regresión Fuerte; **TReg**: Regresión Total; **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total. Los datos del índice de apoptosis para la célula de Sertoli en los grupos de regresión (**MReg, SReg, TReg**) fueron tomados de un estudio previo (Seco-Rovira et al., 2014).



**Gráfico 8**. Índice de proliferación de la célula de Sertoli a lo largo del proceso de regresión, recrudescencia espontánea tras la exposición a fotoperiodo corto y animales control (fotoperiodo largo). <sup>a,</sup> <sup>b, c, d</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **MReg**: Regresión Media; **SReg**: Regresión Fuerte; **TReg**: Regresión Total; **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.



**Gráfico 9**. Ratio entre el índice de apoptosis (**AScI**) y proliferación (**PScI**) para la célula de Sertoli a lo largo del proceso de regresión, recrudescencia espontánea tras la exposición a fotoperiodo corto y animales control (fotoperiodo largo). <sup>a, b, c, d, e</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **MReg**: Regresión Media; **SReg**: Regresión Fuerte; **TReg**: Regresión Total; **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.

#### Estudio cuantitativo

En cuanto al número total de células de Sertoli por testículo, se observó una disminución significativa desde el grupo Control a MRg y desde MRg a SRg, mientras en los otros grupos, se observó un incremento significativo de SRg a TRg, TRg a IR y de IR a AR (p < 0,05) (Gráfico 10). El número total de células de Sertoli en apoptosis por testículo disminuyó y aumentó gradualmente a lo largo de los procesos de regresión y recrudescencia, respectivamente. Así, se observó un incremento significativo en el número total de células de Sertoli apoptóticas en el grupo MRg comparado con el resto de los grupos (p < 0.05), con excepción del grupo Control, mientras que, por otro lado, había una disminución significativa en TRg, IR, y AR con respecto al grupo Control (p < 0.05). No se observaron cambios significativos entre SRg, TR y el grupo Control (Gráfico 11). En cuanto al número de células de Sertoli proliferativas, su número fue significativamente mayor en el grupo **IR** comparado con el resto de grupo (p < 0.05). También fueron significativamente más abundantes en el grupo AR respecto a los grupos **MRg**, **SRg**, **TRg** y **TR**, pero no comparado con el grupo Control (p < 0.05). No se encontraron diferencias significativas entre **TRg**, **TR** y el grupo Control (p < 0.05) (Gráfico 12).



**Gráfico 10**. Número total de células de Sertoli por testículo para cada grupo de estudio. <sup>a, b, c, d</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **MReg**: Regresión Media; **SReg**: Regresión Fuerte; **TReg**: Regresión Total; **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.



**Gráfico 11**. Número total de células de Sertoli en apoptosis por testículo para cada grupo de estudio. <sup>a, b, c, d</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **MReg**: Regresión Media; **SReg**: Regresión Fuerte; **TReg**: Regresión Total; **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.



**Gráfico 12**. Número total de células de Sertoli con capacidad proliferativa por testículo para cada grupo de estudio. <sup>a, b, c, d</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **MReg**: Regresión Media; **SReg**: Regresión Fuerte; **TReg**; Regresión Total; **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.

En cuanto la ratio del número total de espermatogonias / número total de células de Sertoli se observó una disminución significativa entre **MRg** a **SRg** y **TRg** (p < 0,05). No se observaron diferencias significativas para el resto de los grupos (**Gráfico 13**). En cuanto a la relación entre el número total de espermatocitos / número total de células de Sertoli, se observó una disminución significativa ente **MRg** a **SRg** y de **SRg** a **TRg** mientras que había un incremento significativo en **IR**, **AR** y **TR** comparado con el grupo **TRg** (p < 0,05) (**Gráfico 14**). Finalmente, la ratio número total de espermátidas redondas / número total de células de Sertoli se observó una disminución significativa desde **MRg**, a **SRg** y de **SRg** a **TRg** mientras que había un incremento significativo en **IR**, **AR** y **TR** comparado con el grupo



**Gráfico 13**. Ratio entre el número total de espermatogonias y el número total de célula de Sertoli para cada grupo de estudio. <sup>a, b, c</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **MReg**: Regresión Media; **SReg**: Regresión Fuerte; **TReg**: Regresión Total, **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.



**Gráfico 14**. Ratio entre el número total de espermatocitos y el número total de célula de Sertoli para cada grupo de estudio. <sup>a, b, c, d</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **MReg**: Regresión Media; **SReg**: Regresión Fuerte; **TReg**: Regresión Total, **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.


**Gráfico 15**. Ratio entre el número total de espermátidas y el número total de célula de Sertoli para cada grupo de estudio. <sup>a, b, c, d, e</sup> indican diferencias significativas entre los grupos de estudio (p<0,05). **MReg**: Regresión Media; **SReg**: Regresión Fuerte; **TReg**: Regresión Total, **IR**: Recrudescencia Inicial; **AR**: Recrudescencia Avanzada; **TR**: Recrudescencia Total.

## 4. CONCLUSIONES

1.- Durante la recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto en el hámster sirio se produce una restauración de los tejidos y, en consecuencia, de la estructura del testículo. A nivel histomorfométrico, ésta se manifiesta en dos fases; una primera donde el túbulo seminífero aumenta en longitud y diámetro, acompañado con un aumento del tejido intersticial o intertubular y, una segunda fase, donde principalmente aumenta el diámetro del túbulo. El epitelio seminífero se recupera gradualmente y como consecuencia se observa cómo va variando el porcentaje de los tipos de secciones tubulares, con epitelios seminíferos incompletos al inicio de la recrudescencia hasta el final de ella donde se alcanza la espermatogénesis completa. A nivel celular, en el epitelio seminífero, en la primera mitad de la recrudescencia hay un descenso en la apoptosis de células germinales y, a su vez, desde el inicio del proceso de la recrudescencia, hay un aumento de la proliferación de espermatogonias, permitiendo de este modo su diferenciación en el resto de las células germinales y como consecuencia, formación de espermatozoides (**Artículo 1**).

2.- Determinadas lectinas que permitieron detectar histoquímicamente la apoptosis de las células germinales durante la recrudescencia, estas lectinas fueron las mismas que lo

#### CONCLUSIONES

hicieron en la regresión, lo cual confirma la utilidad de ellas como herramienta para la detección de células germinales bajo el fenómeno de apoptosis. Además, se observaron cambios en el patrón de glucoconjugados en el epitelio seminífero y el tejido intersticial durante la recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto. Estos son probablemente debidos a la restauración de los niveles hormonales y al restablecimiento de la espermatogénesis normal que ocurre durante la recrudescencia (**Artículo 2**).

3.- Se ha determinado cualitativa y cuantitativamente tanto actividad proliferativa como apoptótica en la célula de Sertoli durante todo el proceso de regresión y recrudescencia testicular como en animales mantenidos en fotoperiodo largo. Así, la apoptosis de la célula de Sertoli aumenta al inicio de la regresión y disminuye hasta niveles similares al control en fotoperiodo largo al final de ella, no variando después durante todo el proceso de recrudescencia. En cuanto a la proliferación aumenta a mitad de la regresión y alcanza su máximo durante el inicio de la recrudescencia, disminuyendo progresivamente. Todos estos cambios en la actividad apoptótica y proliferativa tienen su reflejo en variaciones de la población de células de Sertoli, que disminuye o aumenta durante la regresión y la recrudescencia, respectivamente. Junto a estos resultados novedosos, también hemos podido constatar que en animales control mantenidos en fotoperiodo largo (animales con competencia reproductora), la célula de Sertoli tiene una tasa habitual de recambio y, por tanto, que no todas las células de Sertoli son quiescentes y terminalmente diferenciadas en estado adulto, al menos en el hámster sirio (**Capítulo de libro, Artículo 3**).

## 5. ARTÍCULOS

## 5.1-ARTÍCULO 1

#### **ORIGINAL ARTICLE**

WILEY Reproduction in Domestic Animals

### Testicular histomorphometry and the proliferative and apoptotic activities of the seminiferous epithelium in Syrian hamster during spontaneous recrudescence after exposure to short photoperiod

Jesús Martínez-Hernández<sup>1</sup> | Vicente Seco-Rovira<sup>1</sup> | Ester Beltrán-Frutos<sup>1</sup> | Concepción Ferrer<sup>1</sup> | Manuel Canteras<sup>2</sup> | María del Mar Sánchez-Huertas<sup>1</sup> | Luis Miguel Pastor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology and Histology, Medical School, IMIB-Arrixaca, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, Murcia, Spain

<sup>2</sup>Department of Statistics, Medical School, University of Murcia, Murcia, Spain

#### Correspondence

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

#### Funding information

Fundación Séneca. Agencia de Ciencia y Tecnología, Región de Murcia, Grant/Award Number: GERM 19892/15

#### Abstract

Syrian hamsters are photoperiodic rodents in which reproduction, including testicular function, is stimulated by long photoperiod exposure and curtailed by exposure to a short photoperiod. The objectives of this study were to characterize the testis histomorphometrically and to determine the role of the proliferation and apoptosis phenomena in the recovery of the seminiferous epithelium during spontaneous recrudescence after exposure to short photoperiod. The study was performed using conventional light microscopy, 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 recrudescence groups: initial recrudescence (IR), advanced recrudescence (AR) and total recrudescence (TR). The results morphometrically pointed to the gradual recovery of the testicular and tubular volumes, as well as of the seminiferous epithelium. Among the IR and AR groups, the increase in testicular and tubular volumes was accompanied by an increase in tubular diameter and length, with an increase in interstitial volume. From AR to TR, there was an increase in the tubular and total volumes, but, in this case, with a gradual increase in tubular diameter. Recovery of the seminiferous epithelium was accompanied by changes in apoptosis and proliferation activities. The first decreased halfway through the process, and the second remained higher than the control levels throughout the recrudescence stage. Alterations in the spermatozoa were ultrastructurally observed, which indicated that spermiogenesis was not yet completely normal. In conclusion, spontaneous testicular recrudescence in Syrian hamster comprises two histomorphometrical phases: the first related to an increase in tubular length and diameter and interstitial volume and the second depending principally on the gradual increase in tubular diameter. The restoration of the seminiferous epithelium is due to apoptosis reaching normal values in the AR group accompanied by higher proliferative activity than that observed in the Control group.

#### KEYWORDS

andrology, apoptosis, photoperiod, proliferation, recrudescence, testes

Reprod Dom Anim. 2018:53:1041-1051.

wileyonlinelibrary.com/journal/rda

© 2018 Blackwell Verlag GmbH | 1041

URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.13201

## 5.2-ARTÍCULO 2

Received: 30 April 2018 | Revised: 26 July 2018 | Accepted: 21 August 2018

DOI: 10.1111/and.13148

#### ORIGINAL ARTICLE

### WILEY **aNDROLOGIA**

# Lectin-binding pattern of glycoconjugates during spontaneous testicular recrudescence in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) after exposure to short photoperiod

Jesús Martínez-Hernández | Vicente Seco-Rovira | Ester Beltrán-Frutos | Concepción Ferrer | María Isabel Serrano-Sánchez | Luis Miguel Pastor 💿

Department of Cell Biology and Histology, Medical School, IMIB-Arrixaca, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, Murcia, Spain

#### Correspondence

Luis Miguel Pastor, Department of Cell Biology and Histology, Medical School, University of Murcia, Espinardo, Murcia, Spain. Email: bioetica@um.es

#### Funding information

Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología. Región de Murcia, Grant/Award Number: GERM 19892/15

#### Abstract

Lectin histochemistry was used to characterise glycoconjugates and cellular apoptosis in the seminiferous epithelium and interstitium of hamster testis during spontaneous recrudescence. An increase in the LTA lectin affinity was observed in spermatids in the Golgi phase. An increase in labelling of PNA and Con-A lectin in acrosome of spermatids (acrosome phase) as well as increased labelling with Con-A in spermatids (cap phase) was observed. Spermatocytes showed decreased affinity with PNA and AAA lectins and an increase in positivity for LTA and GNA lectins. Spermatogonia showed a slight decrease in positivity to WGA and an increase in labelling with Con-A and a decreased affinity for the AAA lectin. At the end of recrudescence, all these germinal cells showed a similar pattern to the control. The Sertoli cells showed a gradual decrease in labelling with the GNA lectin and the Leydig cells an increase in labelling with Con-A and GNA. Particularly unusual was the observation of apoptotic spermatocytes and spermatids positive for PNA, GNA, AAA and Con-A, together with spermatocytes positive to LTA. In conclusion, the normal lectin pattern is recovered during testis recrudescence and germ cell apoptotic activity is low, as is observed by specific lectins for germ cells in apoptosis.

**KEYWORDS** 

apoptosis, hamster, lectins, recrudescence, testes

URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/and.13148

## 5.3-CAPÍTULO DE LIBRO

### **Chapter 5**

### Identification of Proliferative and Apoptotic Sertoli Cells Using Fluorescence and Confocal Microscopy

Jesús Martínez-Hernández, Vicente Seco-Rovira, Ester Beltrán-Frutos, Victor Quesada-Cubo, Concepción Ferrer, and Luis Miguel Pastor

### Abstract

Sertoli cells, the testicular somatic cells of the seminiferous epithelium, are vital for the survival of the epithelium. They undergo proliferation and apoptosis during fetal, neonatal, and prepubertal development. Apoptosis is increased in certain situations such as exposure to many substances, for example, toxics, or short photoperiod in the non-breeding season of some mammals. Therefore, it has always been considered that Sertoli cells that reach adulthood are quiescent cells, that is to say, nonproliferative, do not die, are terminally differentiated, and whose numbers remain constant. Recently, a degree of both proliferation and apoptosis has been observed in normal adult conditions, suggesting that consideration of this cell as quiescent may be subject to change. All this make it necessary to use histochemical techniques to demonstrate whether Sertoli cells are undergoing proliferation or apoptosis in histological sections and to allow the qualitative and quantitative study of these. In this chapter, we present two double-staining techniques that can be used for identifying Sertoli cells in proliferation or apoptosis by fluorescence microscopy. In both, the Sertoli cells are identified by an immunohistochemistry for vimentin followed by an immunohistochemistry for PCNA or a TUNEL histochemistry.

Key words Proliferation, Confocal, Fluorescence, Sertoli cell, Apoptosis, Seminiferous epithelium, Testis, Syrian hamster

URL: https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-7698-0\_5

## 5.4-ARTÍCULO 3

### ARTÍCULO 3

Biology of Reproduction, 2019, 1–10 doi:10.1093/biolre/ioz198 Research Article Advance Access Publication Date: 17 October 2019

OXFORD

### **Research Article**

### Proliferation, apoptosis, and number of Sertoli cells in the Syrian hamster during recrudescence after exposure to short photoperiod<sup>†</sup>

#### Jesús Martínez-Hernández, Vicente Seco-Rovira, Ester Beltrán-Frutos, Concepción Ferrer, María Isabel Serrano-Sánchez and Luis Miguel Pastor\*

Department of Cell Biology and Histology, Medical School, IMIB-Arrixaca, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, Murcia, Spain

\*Correspondence: Department of Cellular Biology and Histology, School of Medicine, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia, Spain. Tel: +34 868 88 39 49; Fax: +34 868 88 41 50; E-mail: bioetica@um.es

<sup>+</sup> Grant support: This work was supported by grant GERM 19892/15 of Fundación Séneca, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

\*Conference Presentation: Some portions of this report formed part of an abstract for XIX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, IV Congreso Iberoamericano de Histología, VII Internacional Congress of Histology and Tissue Engineering, 5 – 8 de Septiembre de 2017, Santiago de Compostela, Spain.

Received 27 December 2018; Revised 17 May 2019; Editorial Decision 4 October 2019; Accepted 7 October 2019

#### Abstract

The Sertoli cell (Sc) has been described as a quiescent cell once the animal has reached sexual maturity. Syrian hamster is an animal that displays testicular regression due to short photoperiod, during which process germ cells and Sc are removed through apoptosis. The aim of this work was to investigate histochemically whether the spontaneous testicular recrudescence processes after exposure to a short photoperiod lead to an increase in Sc proliferative activity in order to restore the normal population. Three spontaneous recrudescence groups were established: initial (IR), advanced (AR), and total (TR) recrudescence, which were compared with animal undergoing the regression process (mild: MRg, strong: SRg, and total: TRg) and animals in long photoperiod (Controls). Histological sections were submitted to histochemical techniques for detecting apoptotic and proliferative Sc with bright-field and fluorescence microscopy. For each group, the proliferative Sc index (PScI) and apoptotic Sc index (AScI), and the total number of Sc were obtained. The results revealed the existence of Vimentin+/TUNEL+ as well as Vimentin+/PCNA+ cells. The PScI was significantly higher in TRg and IR than in the other groups. The AScI was only significantly higher in MRg and SRg with respect to the other groups. The total number of Sc increased among TRg, IR, and AR, reaching values similar to those of the Controls. In conclusion, the increase in Sc proliferation from final regression and recrudescence, accompanied by a similar rate of apoptosis to the Control group, is the cause of the restoration of the Sc population during spontaneous recrudescence.

URL: <u>https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/102/3/588/5588760?redirectedFrom=fulltext</u>

## 6. REFERENCIAS

- Abercrombie, M. (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. Anat Rec, 94, 239-247. doi:10.1002/ar.1090940210
- Ahmed, E. A., Barten-van Rijbroek, A. D., Kal, H. B., Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S. C., van Pelt, A. M., & de Rooij, D. G. (2009). Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biol Reprod*, 80(6), 1084-1091. doi:10.1095/biolreprod.108.071662
- Aiyama, Y., Tsunekawa, N., Kishi, K., Kawasumi, M., Suzuki, H., Kanai-Azuma, M., . .
  . Kanai, Y. (2015). A Niche for GFRα1-Positive Spermatogonia in the Terminal Segments of the Seminiferous Tubules in Hamster Testes. *Stem Cells*, 33(9), 2811-2824. doi:10.1002/stem.2065
- 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. J Morphol, 274(11), 1230-1238. doi:10.1002/jmor.20175
- Arya, M., & Vanha-Perttula, T. (1984). Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis. *Andrologia*, 16(6), 495-508. doi:10.1111/j.1439-0272.1984.tb00404.x

- Arya, M., & Vanha-Perttula, T. (1986). Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse, and nutria. *Am J Anat*, 175(4), 449-469. doi:10.1002/aja.1001750405
- 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. *Anat Embryol (Berl)*, 178(2), 129-136. doi:10.1007/BF02463646
- 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. *Anat Rec*, 239(2), 137-149. doi:10.1002/ar.1092390204
- Avilés, M., Okinaga, T., Shur, B. D., & Ballesta, J. (2000). Differential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. *Mol Reprod Dev*, 57(3), 296-308. doi:10.1002/1098-2795(200011)57:3<296::AID-MRD12>3.0.CO;2-R
- Badia, E., Pinart, E., Briz, M., Pastor, L. M., Sancho, S., Garcia-Gil, N., . . . Bonet, S. (2005). Lectin histochemistry of the boar bulbourethral glands. *Eur J Histochem*, 49(2), 131-138.
- 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. *Biol Reprod*, 35(5), 1289-1297. doi:10.1095/biolreprod35.5.1289
- Beltrán-Frutos, E., Seco-Rovira, V., Martínez-Hernández, J., Ferrer, C., & Pastor, L. M. (2018). Loss of hamster Leydig cells during regression after exposure to a short photoperiod. *Reprod Fertil Dev*, 30(8), 1137-1144. doi:10.1071/RD17409
- Berndtson, W. E., & Desjardins, C. (1974). Circulating LH and FSH levels and testicular function in hamsters during light deprivation and subsequent photoperiodic stimulation. *Endocrinology*, 95(1), 195-205. doi:10.1210/endo-95-1-195
- 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. doi:10.1016/0093-691x(83)90204-2
- Blanco-Rodríguez, J., & Martínez-García, C. (1996). Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif, 29*(1), 13-31. doi:10.1111/j.1365-2184.1996.tb00091.x
- 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. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.01.041

- Bronson, F.H. (1999). Puberty and energy reserves: A walk on the wild side. In K. Wallen & J.S. Schnider. (Eds.), *Reproduction in context* (pp. 15–33). Cambridge, MA: MIT Pres.
- Buzzard, J. J., Wreford, N. G., & Morrison, J. R. (2003). Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology*, 144(9), 3722-3731. doi:10.1210/en.2003-0379
- Calvo, A., Pastor, L. M., Horn, R., & Pallares, J. (1995). Histochemical study of glycoconjugates in the epididymis of the hamster (Mesocricetus auratus). *Histochem J*, 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. *J Reprod Fertil*, *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. *Histochem J*, 22(1), 24-35. doi:10.1007/BF01962876
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev*, 82(4), 825-874. doi:10.1152/physrev.00009.2002
- 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.
- Figueiredo, A. F., França, L. R., Hess, R. A., & Costa, G. M. (2016). Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats. *Cell Cycle*, 15(18), 2486-2496. doi:10.1080/15384101.2016.1207835
- Floderus S. (1944). Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. Acta Pathtological and Microbiolgical Scandinavica. Suppl. 53: 1-276.
- Gerlach, T., & Aurich, J. E. (2000). Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim Reprod Sci*, 58(3-4), 197-213. doi:10.1016/s0378-4320(99)00093-7
- Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 9(4), 411-416. doi:10.1006/scdb.1998.0203
- Guan, Y., Liang, G., Hawken, P. A., Meachem, S. J., Malecki, I. A., Ham, S., . . . Martin, G. B. (2014). Nutrition affects Sertoli cell function but not Sertoli cell numbers in sexually mature male sheep. *Reprod Fertil Dev.* doi:10.1071/RD14368

- Heiskanen, P., Billig, H., Toppari, J., Kaleva, M., Arsalo, A., Rapola, J., & Dunkel, L. (1996). Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: the effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival. *Pediatr Res*, 40(2), 351-356. doi:10.1203/00006450-199608000-00026
- Hikim, A. P., Bartke, A. J., & Russell, L. D. (1988). The seasonal breeding hamster as a model to study structure-function relationships in the testis. *Tissue Cell*, 20(1), 63-78. doi:10.1016/0040-8166(88)90008-0
- 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 gonadotropinreleasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 136(6), 2770-2775. doi:10.1210/endo.136.6.7750502
- 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. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(1), 152-156. doi:10.1210/jcem.83.1.4485
- Hochereau-de Reviers, M. T., & Lincoln, G. A. (1978). Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, Cervus elaphus. *J Reprod Fertil*, 54(2), 209-213. doi:10.1530/jrf.0.0540209
- Hochereau-de Reviers, M. T., Perreau, C., & Lincoln, G. A. (1985). Photoperiodic variations of somatic and germ cell populations in the Soay ram testis. *J Reprod Fertil*, 74(2), 329-334. doi:10.1530/jrf.0.0740329
- 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. *Microsc Res Tech*, 20(3), 268-273. doi:10.1002/jemt.1070200306
- Hu, X., Ge, X., Liang, W., Shao, Y., Jing, J., Wang, C., . . . Yao, B. (2018). Effects of saturated palmitic acid and omega-3 polyunsaturated fatty acids on Sertoli cell apoptosis. Syst Biol Reprod Med, 64(5), 368-380. doi:10.1080/19396368.2018.1471554
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res, 301*(1), 5-17. doi:10.1007/s004410000193
- Jin, W., Herath, C. B., Yoshida, M., Arai, K. Y., Saita, E., Zhanquan, S., . . . Taya, K. (2002). Inhibin B regulating follicle-stimulating hormone secretion during testicular recrudescence in the male golden hamster. *J Androl*, 23(6), 845-853.
- Johnson, L., Varner, D. D., Roberts, M. E., Smith, T. L., Keillor, G. E., & Scrutchfield, W. L. (2000). Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. Anim Reprod Sci, 60-61, 471-480. doi:10.1016/s0378-4320(00)00108-1
- 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. *Histochem J*, 24(6), 327-336. doi:10.1007/BF01046164

- Kasper, M., & Singh, G. (1995). Epithelial lung cell marker: current tools for cell typing. *Histol Histopathol*, 10(1), 155-169.
- Kelly, K. K., Goldman, B. D., & Zucker, I. (1994). Gonadal growth and hormone concentrations in photoregressed Siberian hamsters: pinealectomy versus photostimulation. *Biol Reprod*, 51(5), 1046-1050. doi:10.1095/biolreprod51.5.1046
- Kulibin, A. Y., & Malolina, E. A. (2016). Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture. *Reproduction*, 152(4), 271-281. doi:10.1530/REP-16-0013
- Kurohmaru, M., Kanai, Y., & Hayashi, Y. (1991). Lectin-binding patterns in the spermatogenic cells of the shiba goat testis. J Vet Med Sci, 53(5), 893-897. doi:10.1292/jvms.53.893
- 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. *J Anat*, 187 (*Pt 2*), 323-329.
- Kurohmaru, M., Maeda, S., Suda, A., Hondo, E., Ogawa, K., Endo, H., . . . Nishida, T. (1996). An ultrastructural and lectin-histochemical study on the seminiferous epithelium of the common tree shrew (Tupaia glis). *J Anat, 189 (Pt 1)*, 87-95.
- 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.
- Loveland, K. L., & Schlatt, S. (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *J Endocrinol*, *153*(3), 337-344. doi:10.1677/joe.0.1530337
- Luaces, J. P., Rossi, L. F., Merico, V., Zuccotti, M., Redi, C. A., Solari, A. J., ... Garagna, S. (2013). Spermatogenesis is seasonal in the large hairy armadillo, Chaetophractus villosus (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia). *Reprod Fertil Dev*, 25(3), 547-557. doi:10.1071/RD12127
- Lucas, T. F., Nascimento, A. R., Pisolato, R., Pimenta, M. T., Lazari, M. F., & Porto, C. S. (2014). Receptors and signaling pathways involved in proliferation and differentiation of Sertoli cells. *Spermatogenesis*, 4, e28138. doi:10.4161/spmg.28138
- 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. *J Androl*, 18(2), 166-173.
- Madrid, J. F., Hernández, F., & Ballesta, J. (1997). Characterization of glycoproteins in the epithelial cells of human and other mammalian gallbladder. A review. *Microsc Res Tech*, 38(6), 616-630. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19970915)38:6<616::AID-JEMT6>3.0.CO;2-C

- Madrid, J. F., Leis, O., Díaz-Flores, L., Sáez, F. J., & Hernández, F. (1998). Lectin-gold localization of fucose residues in human gastric mucosa. J Histochem Cytochem, 46(11), 1311-1320. doi:10.1177/002215549804601111
- 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. doi:10.1007/BF00270391
- Martínez-Menárguez, J. A., Avilés, M., Madrid, J. F., Castells, M. T., & Ballesta, J. (1993). Glycosylation in Golgi apparatus of early spermatids of rat. A high resolution lectin cytochemical study. *Eur J Cell Biol*, 61(1), 21-33.
- McCoard, S. A., Lunstra, D. D., Wise, T. H., & Ford, J. J. (2001). Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. *Biol Reprod*, 64(2), 689-695. doi:10.1095/biolreprod64.2.689
- 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. *Biol Reprod*, 72(5), 1187-1193. doi:10.1095/biolreprod.104.039321
- Meachem, S. J., Schlatt, S., Ruwanpura, S. M., & Stanton, P. G. (2007). The effect of testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol on the re-initiation of spermatogenesis in the adult photoinhibited Djungarian hamster. J Endocrinol, 192(3), 553-561. doi:10.1677/JOE-06-0136
- Morales, E., Pastor, L. M., Horn, R., Zuasti, A., Ferrer, C., Calvo, A., . . . Canteras, M. (2003). Effect of ageing on the proliferation and apoptosis of testicular germ cells in the Syrian hamster Mesocricetus auratus. *Reprod Fertil Dev*, 15(1-2), 89-98. doi:10.1071/rd02071
- Morales, E., Horn, R., Pastor, L. M., Santamaría, L., Pallarés, J., Zuasti, A., ... Canteras, M. (2004). Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. *Histol Histopathol*, 19(2), 445-455. doi:10.14670/HH-19.445
- 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. J Mol Histol, 36(4), 235-242. doi:10.1007/s10735-005-5784-z
- 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. *J Cell Biol*, 74(3), 950-962. doi:10.1083/jcb.74.3.950

- Parillo, F., Verini Supplizi, A., Mancuso, R., & Catone, G. (2012). Glycomolecule modifications in the seminiferous epithelial cells and in the acrosome of posttesticular spermatozoa in the alpaca. *Reprod Domest Anim*, 47(4), 675-686. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01134.x
- 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. *Histochem J*, 24(10), 727-736. doi:10.1007/BF01460825
- Pastor, L. M., Ferran, A., Calvo, A., Sprekelsen, C., Horn, R., & Marin, J. A. (1994). Morphological and histochemical study of human submucosal laryngeal glands. *Anat Rec*, 239(4), 453-467. doi:10.1002/ar.1092390411
- 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 Histochem, 105(2), 165-173. doi:10.1078/0065-1281-00701
- Pastor, L. M., Lucas, X., Pallares, J., Bernal-Mañas, C. M., Martinez, E. A., Roca, J., . . . Ferrer, C. (2008). Characterization of glycoside residues of porcine zona pellucida and ooplasm during follicular development and atresia. *Mol Reprod Dev*, 75(9), 1473-1483. doi:10.1002/mrd.20886
- Pastor, L. M., Zuasti, A., Ferrer, C., Bernal-Mañas, C. M., Morales, E., Beltrán-Frutos, E., & Seco-Rovira, V. (2011). Proliferation and apoptosis in aged and photoregressed mammalian seminiferous epithelium, with particular attention to rodents and humans. *Reprod Domest Anim*, 46(1), 155-164. doi:10.1111/j.1439-0531.2009.01573.x
- Pelletier, R. M. (1986). Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (Mustela vison), a seasonal breeder. *Am J Anat, 175*(1), 91-117. doi:10.1002/aja.1001750109
- Perez-Tomas, R., Ballesta, J., Madrid, J. F., Pastor, L. M., & Hernandez, F. (1990). Histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of the tortoise Testudo graeca (Testudines). J Morphol, 204(3), 235-245. doi:10.1002/jmor.1052040302
- Phillips, B. T., Gassei, K., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1546), 1663-1678. doi:10.1098/rstb.2010.0026
- Pinart, E., Bonet, S., Briz, M., Pastor, L. M., Sancho, S., García, N., ... Bassols, J. (2001). Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid postpubertal boars. *Int J Androl*, 24(3), 153-164. doi:10.1046/j.1365-2605.2001.00282.x
- Rai, N. K., Tripathi, K., Sharma, D., & Shukla, V. K. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, 4(3), 138-144. doi:10.1177/1534734605280018

- Ramos, A. S., & Dym, M. (1979). Ultrastructural differentiation of rat Sertoli cells. *Biol Reprod*, 21(4), 909-922. doi:10.1095/biolreprod21.4.909
- 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. *Histochem Cell Biol*, 106(1), 131-148. doi:10.1007/BF02473207
- 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. *Int J Androl, 18*(1), 13-22. doi:10.1111/j.1365-2605.1995.tb00929.x
- Sasso-Cerri, E., & Miraglia, S. M. (2002). In situ demonstration of both TUNEL-labeled germ cell and Sertoli cell in the cimetidine-treated rats. *Histol Histopathol*, *17*(2), 411-417. doi:10.14670/HH-17.411
- Sato, T., Tachiwana, T., Takata, K., Tay, T. W., Ishii, M., Nakamura, R., ... Hayashi, Y. (2005). Testicular dynamics in Syrian hamsters exposed to both short photoperiod and low ambient temperature. *Anat Histol Embryol*, 34(4), 220-224. doi:10.1111/j.1439-0264.2005.00599.x
- Schwarz, M. A., & Koehler, J. K. (1979). Alterations in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosome reaction. *Biol Reprod*, 21(5), 1295-1307. doi:10.1095/biolreprod21.5.1295
- 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. *Anat Embryol (Berl)*, 208(2), 151-159. doi:10.1007/s00429-004-0385-2
- Seco-Rovira, V., Beltrán-Frutos, E., Ferrer, C., Sánchez-Huertas, M. M., Madrid, J. F., Saez, F. J., & Pastor, L. M. (2013). Lectin histochemistry as a tool to identify apoptotic cells in the seminiferous epithelium of Syrian hamster (Mesocricetus auratus) subjected to short photoperiod. *Reprod Domest Anim, 48*(6), 974-983. doi:10.1111/rda.12196
- Seco-Rovira, V., Beltrán-Frutos, E., Ferrer, C., Sáez, F. J., Madrid, J. F., & Pastor, L. M. (2014). The death of sertoli cells and the capacity to phagocytize elongated spermatids during testicular regression due to short photoperiod in Syrian hamster (Mesocricetus auratus). *Biol Reprod*, 90(5), 107. doi:10.1095/biolreprod.113.112649
- Seco-Rovira, V., Beltrán-Frutos, E., Ferrer, C., Saez, F. J., Madrid, J. F., Canteras, M., & Pastor, L. M. (2015). Testicular histomorphometry and the proliferative and apoptotic activities of the seminiferous epithelium in Syrian hamster (Mesocricetus auratus) during regression owing to short photoperiod. *Andrology*, 3(3), 598-610. doi:10.1111/andr.12037

- Seco-Rovira, V., Beltrán-Frutos, E., Martínez-Hernández, J., Ferrer, C., & Pastor, L. M. (2017). The Use of Lectin Histochemistry for Detecting Apoptotic Cells in the Seminiferous Epithelium. *Methods Mol Biol*, 1560, 133-144. doi:10.1007/978-1-4939-6788-9\_9
- 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. doi:10.1530/rep.0.1250769
- 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. *Anat Histol Embryol*, 29(2), 73-82. doi:10.1046/j.1439-0264.2000.00233.x
- Sinha Hikim, A. P., Bartke, A., & Russell, L. D. (1988). Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biol Reprod*, 39(5), 1225-1237. doi:10.1095/biolreprod39.5.1225
- Sinha Hikim, A. P., Rajavashisth, T. B., Sinha Hikim, I., Lue, Y., Bonavera, J. J., Leung, A., . . . Swerdloff, R. S. (1997). Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod*, 57(5), 1193-1201. doi:10.1095/biolreprod57.5.1193
- Sinha Hikim, A. P., & Swerdloff, R. S. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*, 4(1), 38-47. doi:10.1530/ror.0.0040038
- Spicer, S. S. (1993). Advantages of histochemistry for the study of cell biology. *Histochem J*, 25(8), 531-547.
- 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. doi:10.1007/BF02400975
- Tarulli, G. A., Stanton, P. G., & Meachem, S. J. (2012). Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol Reprod*, 87(1), 13, 11-11. doi:10.1095/biolreprod.111.095091
- Tegelenbosch, R. A., & de Rooij, D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res, 290*(2), 193-200. doi:10.1016/0027-5107(93)90159-d
- Tsubota, T., Howell-Skalla, L., Nitta, H., Osawa, Y., Mason, J. I., Meiers, P. G., ... Bahr, J. M. (1997). Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear Ursus americanus. J Reprod Fertil, 109(1), 21-27. doi:10.1530/jrf.0.1090021
- Turek, F. W., Elliott, J. A., Alvis, J. D., & Menaker, M. (1975). Effect of prolonged exposure to nonstimulatory photoperiods on the activity of the neuroendocrine-

testicular axis of golden hamsters. *Biol Reprod*, 13(4), 475-481. doi:10.1095/biolreprod13.4.475

- Tähkä, K. M., Zhuang, Y. H., Tähkä, S., & Tuohimaa, P. (1997a). Photoperiod-induced changes in androgen receptor expression in testes and accessory sex glands of the bank vole, Clethrionomys glareolus. *Biol Reprod*, 56(4), 898-908. doi:10.1095/biolreprod56.4.898
- Wine, R. N., & Chapin, R. E. (1997). Evaluation of the binding patterns of eleven FITCconjugated lectins in Fischer 344 rat testes. J Androl, 18(1), 71-79.
- Wing, T. Y., & Christensen, A. K. (1982). Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat, 165*(1), 13-25. doi:10.1002/aja.1001650103
- 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. Arch Gerontol Geriatr, 55(1), 116-119. doi:10.1016/j.archger.2011.05.005
- Yagi, M., Suzuki, K., & Suzuki, H. (2006). Apoptotic Sertoli cell death in hypogonadic (hgn/hgn) rat testes during early postnatal development. Asian J Androl, 8(5), 535-541. doi:10.1111/j.1745-7262.2006.00181.x
- Young, K. A., & Nelson, R. J. (2001). Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction*, 122(5), 677-685. doi:10.1530/rep.0.1220677
- Zucker I. Circannual Rhythms Mammals. In: Takahashi J.S., Turek F.W., Moore R.Y. (eds) *Circadian Clocks. Handbook of Behavioral Neurobiology* (2001), vol 12. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1201-1\_20

## 7. RESUMEN CORTO
Numerosos mamíferos presentan una reproducción de carácter estacional que hace que las crías nazcan en el mejor momento para su supervivencia. Los machos padecen una infertilidad temporal adquirida tras un proceso de regresión testicular del cual tienen que recuperarse, en un proceso conocido como recrudescencia, en el que los testículos vuelven a producir espermatozoides competentes para la reproducción. El objetivo de esta tesis doctoral ha sido estudiar el túbulo seminífero del hámster sirio durante la recrudescencia espontánea tras la exposición a un fotoperiodo corto. Para ello, se han determinado sus cambios histomorfométricos así como las actividades de proliferación y apoptosis en las células germinales y en la célula de Sertoli durante este proceso.

Se utilizaron 53 hámsteres sirios machos mantenidos en fotoperiodo de 14:10h luz-oscuridad. De ellos, 5 se utilizaron como grupo de Control mantenidos en el mismo fotoperiodo (14:10h luz-oscuridad). Los otros 48 animales se sometieron a un fotoperiodo de 8:16h de luz-oscuridad. Se establecieron los siguientes grupos de estudio: regresión media (**MReg**), regresión fuerte (**SReg**), regresión total (**TReg**), recrudescencia inicial (**IR**), recrudescencia avanzada (**AR**) y recrudescencia total (**TR**). Las siguientes técnicas histológicas fueron utilizadas: hematoxilina-eosina, inmunohistoquímica de vimentina y PCNA, histoquímica de lectinas y TUNEL, y, para fluorescencia: doble inmunofluorescencia de vimentina y PCNA. Se realizó también un estudio morfométrico.

## **RESUMEN CORTO**

Durante la recrudescencia hay una recuperación gradual del volumen testicular, tubular y del epitelio seminífero. El volumen intersticial, la longitud y el diámetro tubular aumentaron principalmente en la primera mitad del proceso. La actividad proliferativa de las espermatogonias fue siempre mayor que la del grupo Control y la actividad apoptótica disminuyó en la primera mitad de la recrudescencia. Las lectinas mostraron cambios en el patrón de glucoconjugados al inicio del proceso, aunque gradualmente se fue recuperando un patrón similar al del grupo Control. Por otro lado, los espermatocitos y espermátidas en apoptosis mostraron gran afinidad por las lectinas PNA, GNA, AAA y Con-A, además, para los espermatocitos en apoptosis, también la lectina LTA. En todos los grupos se observó células de Sertoli vimentina+/TUNEL + y células vimentina+/PCNA+. El índice de apoptosis para la célula de Sertoli fue mayor en **TRg** e **IR** respecto al resto de grupos. El número total de células de Sertoli aumentó entre **TRg, IR y AR**, donde alcanzó valores del grupo Control.

En conclusión, la recrudescencia espontánea del testículo de hámster sirio comprende dos fases histomorfométricas. La primera con incremento del diámetro y longitud tubular, con aumento del volumen intersticial y, una segunda, con incremento gradual de diámetro tubular. La recuperación del epitelio seminífero se debe al aumento de proliferación en las espermatogonias en la recrudescencia a la par que la apoptosis de las células germinales disminuye a valores del control a la mitad del proceso. La histoquímica de lectinas confirmó su utilidad para detectar células germinales en apoptosis. Finalmente, el aumento de proliferación y diminución de apoptosis de la célula de Sertoli permitió restablecer su número después de la pérdida ocurrida durante la regresión, hecho fundamental para la recuperación de la fertilidad. La constatación de una tasa de recambio (proliferación / apoptosis) en los animales mantenidos en fotoperiodo largo indican que la célula de Sertoli no está terminalmente diferenciada en el hámster sirio adulto.

Many mammals have a seasonal reproduction that causes the offspring to be born at the best time for their survival. Males suffer from a temporary infertility acquired after a process of testicular regression, from which they recover through a process known as recrudescence, in which the testes start to produce valid sperm for reproduction again. The aim of this doctoral thesis was to study the seminiferous tubule of the Syrian hamster during spontaneous recrudescence after exposure to short photoperiod. In order to do this, their histomorphometric changes during this process have been determined, as well as proliferation and apoptosis activities in germ cells and in the Sertoli cell.

53 male Syrian hamsters were used. They were kept in a 14:10 light-dark photoperiod. Out of these, 5 were used as a Control group and kept in the same photoperiod (14:10 light-dark). The other 48 animals were subjected to photoperiod of 8:16 h light-dark. The following study groups were established: mild regression (**MReg**), strong regression (**SReg**), total regression (**TReg**), initial recrudescence (**IR**), advanced recrudescence (**AR**) and total recrudescence (**TR**). The following histological techniques were used: hematoxylin-eosin, immunohistochemistry of vimentin and PCNA, histochemistry of lectins and TUNEL, and, for fluorescence: double immunofluorescence of vimentin and PCNA. A morphometric study was also carried out.

## **RESUMEN CORTO**

During recrudescence, there is a gradual recovery of the testicular, tubular, and seminiferous epithelium volume. The interstitial volume, length and tubular diameter increased mainly in the first half of the process. The proliferative activity of the spermatogonia was always greater than that of the Control group and the apoptotic activity decreased in the first half of the recrudescence. Lectins showed changes in the pattern of glycoconjugates at the beginning of the process, but it was gradually recovering a similar pattern to that of the control group. On the other hand, spermatocytes and spermatids in apoptosis showed great affinity for the lectins PNA, GNA, AAA and Con-A, in addition, for spermatocytes in apoptosis, also the LTA lectin. Sertoli vimentin +/TUNEL + cells and vimentin +/PCNA + cells were observed in all groups. The apoptosis index was higher in **TRg** and **IR** compared to the rest of the groups. The total number of Sertoli cells increased between **TRg**, **IR** and **AR**, where it reached Control values.

In conclusion, the spontaneous recrudescence of the Syrian hamster testis has two histomorphometric phases. The first phase involves an increase in tubular diameter and length and an increase in interstitial volume. And the second phase presents a gradual increase in tubular diameter. The recovery of the seminiferous epithelium is due to the increased proliferation in spermatogonia in recrudescence. Germ cell apoptosis decreases to control values in the half of recrudescence process. Lectin histochemistry confirmed their utility for detecting germ cells in apoptosis. Finally, the increase in proliferation and decrease in apoptosis of the Sertoli cell allowed them to reestablish their number after the loss that occurred during regression, which is essential for the recovery of fertility. The finding of a turnover rate (proliferation / apoptosis) in animals kept in long photoperiod indicates that the Sertoli cell is not terminally differentiated in the adult Syrian hamster.