



Proliferación de las células germinales: estudio de la regulación molecular y endócrina en el pez teleósteo *Oryzias latipes*

Biólogo. Omar David Moreno Acosta

Director: Dr. Juan I. Fernandino

Tesis para optar por el título:

“Doctor en Biología Molecular y Biotecnología”

Universidad Nacional de San Martín

Laboratorio de Biología del Desarrollo

Instituto Tecnológico Chascomús

INTECH (CONICET-UNSAM)

RESUMEN

La producción de gametos es un proceso fundamental para la reproducción; sin embargo, la exposición al estrés, como el aumento de la temperatura, puede disminuir o incluso interrumpir este proceso, con consecuencias negativas en la fertilidad. Es por esto que la supervivencia de las células madre espermatogoniales (*spermatogonial stem cells* o SSC) es crucial para la recuperación de la espermatogénesis en situaciones estresantes. En esta tesis demostramos que la vía de Notch está implicada en dicha supervivencia, al proteger las SSC contra el estrés térmico. Primero, corroboramos el deterioro de la espermatogénesis bajo estrés por calor en medaka, observando una detención en la metafase I a los 10 días de tratamiento térmico, un aumento en el número de espermatoцитos y una regulación negativa de genes clave involucrados en la proliferación y diferenciación de las espermatogonias, como *ndrg1b* y *sycp3*. Además, a los 30 días de tratamiento térmico se observó una interrupción de la espermatogénesis con una fuerte pérdida de espermatoцитos y espermátidas. Además, la exposición de machos adultos a condiciones de estrés térmico indujo apoptosis principalmente en células espermatogénicas y somáticas de soporte, con excepción de la región germinal, donde se ubican las SSC. Al mismo tiempo, los genes relacionados con la vía Notch estaban regulados positivamente, incluidos los ligandos (*dll4*, *jag1-2*) y los receptores (*notch 1a-3*). Concomitantemente durante el estrés térmico, presenilin enhancer-2 (*pen-2*), la subunidad catalítica del complejo γ -secretasa de la vía Notch, se restringió a la región germinal del testículo medaka, observado en las células somáticas que rodean las espermatogonias tipo A. La importancia de la vía Notch se vio respaldada aún más por un enfoque *ex vivo*, en el que la inhibición de la actividad de esta vía indujo una pérdida de SSC. En resumen, este estudio respalda la importancia de las vías de Notch para la protección de las SSC bajo estrés térmico crónico.

Palabras claves: presenilin enhancer-2, células germinal, testículo, medaka, apoptosis

ABSTRACT

Gamete production is a fundamental process for reproduction; however, exposure to stress, such as increased environmental temperature, can decrease or even interrupt this process, affecting fertility. Thus, the survival of spermatogonial stem cells (SSCs) is crucial for the recovery of spermatogenesis upon stressful situations. Here, we show that the Notch pathway is implicated in such survival, by protecting the SSCs against thermal stress. First, we corroborated the impairment of spermatogenesis under heat stress in medaka, observing an arrest in metaphase I at 10 days of heat treatment, an increase in the number of spermatocytes, and downregulation of *ndrg1b* and *sycp3*. In addition, at 30 days of treatment, an interruption of spermatogenesis was observed with a strong loss of spermatocytes and spermatids. Then, the exposure of adult males to thermal stress condition induced apoptosis mainly in spermatogenic and supporting somatic cells, with the exception of the germinal region, where SSCs are located. Concomitantly, the Notch pathway-related genes were upregulated, including the ligands (*dll4*, *jag1-2*) and receptors (*notch1a-3*). Moreover, during thermal stress presenilin enhancer-2 (*pen-2*), the catalytic subunit of γ -secretase complex of the Notch pathway was restricted to the germinal region of the medaka testis, observed in somatic cells surrounding type A spermatogonia (SGa). The importance of the Notch pathway was further supported by an *ex vivo* approach, in which the inhibition of this pathway activity induced a loss of SSCs. Overall, this study supports the importance of Notch pathways for the protection of SSCs under chronic thermal stress.

Keywords: presenilin enhancer-2, Germline, Testis, Medaka, apoptosis

RESUMEN	1
Palabras claves: presenilin enhancer-2, células germinal, testículo, medaka, apoptosis	1
ABSTRACT	2
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE FIGURAS	6
INTRODUCCIÓN	7
Espermatogénesis y homeostasis del nicho celular	11
Vía Notch	16
Notch en la conformación de nichos celulares	17
Vía Notch y espermatogénesis	18
Medaka como modelo para estudiar la espermatogénesis	20
PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Origen de los animales y diseño experimental.	24
Experimentos ex vivo con DAPT	24
Extracción total de ARN	25
PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)	25
Histología, cuantificación celular e IF	28
Ensayo de TUNEL	29
Hibridación in situ en testículos	30
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
Inhibición de la espermatogénesis en machos criados a alta temperatura.	32
Apoptosis de la línea germinal de los testículos a alta temperatura.	35
Identificación de Pen-2 en testículos adultos	37
Regulación positiva de Pen-2 en los testículos a alta temperatura.	38
Activación de la vía Notch en testículos bajo tratamiento a alta temperatura	41
Inhibición de la vía Notch ex vivo en explantes de testículos sometidos a altas temperaturas	43
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES GENERALES	55
DIRECCIONES FUTURAS	57
LISTA DE PUBLICACIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59

AGRADECIMIENTOS

Realizar un doctorado en ciencias ha sido una de las experiencias más desafiantes y gratificantes de mi vida. Este viaje ha estado lleno de alegrías, aprendizajes y momentos difíciles que me han ayudado a crecer y a superarme.

Primero y, ante todo, quiero expresar mi infinita gratitud a mi madre y hermanos. Su amor, apoyo incondicional y confianza en mí han sido mi mayor fortaleza.

A mi director, Juani Fernandino, gracias por tu guía, por no cortar nunca mis alas y permitirme explorar y desarrollar mis ideas. Tu apoyo y confianza han sido fundamentales para mi crecimiento como científico. Agradezco tu paciencia y todos los conocimientos brindados.

Agradezco también al gobierno de Argentina por la beca y la oportunidad de pertenecer al CONICET como becario doctoral. Esta oportunidad ha sido crucial para mi formación y desarrollo profesional.

A mi querido laboratorio de Biología y Desarrollo (LBD) y al doctor Pablo Strobol, así como a mis compañeros Luisa, Sergio, Melisa, y a todos los demás miembros del laboratorio. Especialmente a mi amigo Nagif Alata. Su apoyo y camaradería han sido invaluable. Gracias por estar ahí, por su amistad y por hacer de este viaje una experiencia enriquecedora y memorable. A todas las personas en el instituto, gracias por contribuir tanto en lo personal como en lo académico.

Quiero también agradecer a Elena Carrasquilla, Stefany Guarín, Fernando Villaruel, Sebastián Quiceno, Héctor y Ernesto, quienes estuvieron y me apoyaron en la etapa final de este proceso. Su ayuda y apoyo han sido significativos y no tengo palabras suficientes para expresar mi agradecimiento.

LISTA DE ABREVIATURAS

μm micrómetro

ADNc Ácido Desoxirribonucleico copia o complementario

ADNg Ácido Desoxirribonucleico genómico

ARNm Ácido Desoxirribonucleico mensajero

DEPC dietilpirocarbonato

DIG Digoxigenina

dpe días post eclosión

HIS Hibridación in situ

Ndrg Del inglés N-myc downstream regulated gene

PBSw Buffer fosfato salino con Tween100

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

rpl7 gen de la proteína ribosomal L7

RT-qPCR PCR cuantitativa en Tiempo Real

TESPA 3-aminopropiltriétoxissilina

TUNEL Del inglés TdT-mediated dUTP Nick End Labeling, TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transferase

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. La estructura del testículo y el lóbulo

FIGURA 2. Una vista simplificada de la señalización canónica de Notch

FIGURA 3. Representación esquemática de la estructura de testículos en medaka

FIGURA 4. Inhibición de la espermatogénesis en machos criados a alta temperatura

FIGURA 5. qPCR: Cuantificación de la abundancia de los transcritos

FIGURA 6. Las altas temperaturas inducen la apoptosis en la línea germinal de los testículos

FIGURA 7. Pen-2 se regula al alza durante el tratamiento térmico en machos.

FIGURA 8. Vía Notch: Niveles de abundancia de transcripción de **(A)** *pen-2* y **(B)** *hes1* a los 0, 3, 10 y 30 días de tratamiento.

FIGURA 9. IF de Pen-2 (verde) en testículos de machos criados en TA

FIGURA 10. La vía Notch se regula al alza en los testículos a los 10 días de tratamiento térmico
Cuantificación de la transcripción de diferentes receptores de la vía Notch

FIGURA 11. Optimización del tiempo y la dosis para el experimento *ex vivo*

FIGURA 12. La vía Notch protege a la espermatogonia tipo A de la pérdida inducida por el calor.

FIGURA 13. La activación de la vía Notch en células somáticas del testículo induce la inhibición de la espermatogénesis bajo exposición a temperaturas elevadas

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en técnicas de cuantificación y síntesis de sondas de esta tesis

INTRODUCCIÓN

La rápida transformación del entorno global, fruto de la contaminación generada por las actividades humanas, marca un cambio sin precedentes en ritmo y alcance. Este fenómeno impacta directamente a la vida silvestre, exponiéndose a múltiples formas de contaminación antropogénica. Esta contaminación se manifiesta a través de diversos agentes químicos derivados de la producción, uso y desecho de una amplia gama de productos, como pesticidas, fármacos y metales pesados (Dixit et al. 2015, Bernhardt et al. 2017). Además, la contaminación lumínica originada por la actividad humana que ilumina la noche (Longcore y Rich 2004), el ruido proveniente del tránsito, maquinaria y procesos industriales que se expande por los paisajes naturales (Barber et al., 2011), así como la contaminación térmica, tanto a nivel local como global, que altera los nichos en los diferentes ecosistemas (Hansen et al. 2006, Yow 2007), se suman a este problema. Todas estas formas de contaminación pueden desencadenar efectos adversos en las comunidades que habitan estos ecosistemas.

Uno de los resultados más preocupantes de esta contaminación ambiental es la perturbación de los procesos reproductivos (Delbès et al., 2022). Los contaminantes tienen la capacidad de intervenir en una amplia gama de características vitales para el éxito reproductivo, incluyendo la fisiología reproductiva, la función de los gametos y el comportamiento del organismo. Esta interferencia puede disminuir la eficacia del apareamiento, ya sea directamente mediante la reducción de las tasas de fecundidad o indirectamente al modificar la atracción entre parejas y/o las oportunidades de encuentro (Marlatt et al., 2022). Tales efectos pueden causar una marcada alteración en la cantidad y calidad de la descendencia que los individuos pueden aportar a las generaciones futuras, lo que comúnmente se conoce como la "aptitud" de un individuo (Orr, 2009). Estos cambios en la aptitud pueden tener consecuencias perjudiciales a nivel de población y

comunidad, y pueden influir significativamente en las trayectorias evolutivas de las poblaciones afectadas (Aulsebrook et al., 2020).

En las últimas dos décadas se ha revisado repetidamente el impacto del calentamiento global en la reproducción de los peces (Grazer y Martin, 2012; Miranda et al., 2013; Pankhurst y King, 2010; Pankhurst y Munday, 2011; Servili et al., 2020; Van Der Kraak y Pankhurst, 1997), debido principalmente a que este grupo se caracteriza por presentar una enorme variación de los hábitats donde viven y se reproducen. A pesar del aumento constante de estudios en esta área, los avances rápidos en metodologías como la biología molecular y la creciente preocupación pública por la sostenibilidad de los peces, demandan una revisión exhaustiva basada en más trabajos. La importancia de este campo de investigación se acentúa especialmente tras las nuevas proyecciones del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, que muestran un posible aumento en la temperatura media global de la superficie del mar (TSM). Por ejemplo, se espera un incremento a corto plazo de $+0,64\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0,95\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que hacia finales de siglo se prevén $+0,73\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $2,58\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los escenarios optimista y pesimista, respectivamente, por la elevación de los niveles de gases de efecto invernadero (Pörtner et al., 2019). A pesar del calentamiento generalizado, se proyecta una mayor intensidad de cambios en sistemas fluviales y regiones marinas árticas y subárticas (fenómeno conocido como amplificación ártica), como el aumento de $+1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre 1985 y 2012 en el mar de Barents (Kjesbu et al., 2014). Estos cambios se traducirán en una mayor frecuencia de eventos extremos, como por ejemplo las olas de calor en los océanos (Boeke y Taylor, 2018; Pörtner et al., 2019). Este aumento de la temperatura también se ha registrado en ambientes acuáticos continentales, como por ejemplo en la laguna de Chascomús, en donde se recopilaban temperaturas durante 47 años y se ha registrado un aumento de la temperatura de $1.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Elisio et al., 2015).

Dado que la mayoría de los teleósteos son poiquiloterms, la temperatura ambiente incide directamente en su metabolismo, rendimiento reproductivo (Vagner et al., 2019; Wang et al., 2010),

crecimiento corporal, mortalidad natural y éxito en el reclutamiento (Kjesbu et al., 2014), factores vitales en la dinámica poblacional. La respuesta de los peces a las variaciones térmicas varía según la especie y las etapas de su vida, debido a su rango de tolerancia térmica. Sin embargo, las etapas más sensibles al estrés térmico, como el desove y los primeros años de vida, están estrechamente relacionadas con ventanas térmicas más limitadas (Pörtner y Farrell, 2008; Dahlke et al., 2020). Además, la temperatura de desove suele estar vinculada a la preferencia térmica de los embriones (Pörtner y Peck, 2010). Por lo tanto, la investigación en la reproducción de los peces es esencial en el contexto del calentamiento global, ya que la capacidad reproductiva y la adaptabilidad de los individuos influyen en procesos como la adaptación, la especiación y, en última instancia, la supervivencia de las poblaciones afectadas por el cambio climático (Grazer y Martin, 2012).

En la mayoría de las especies de peces el ciclo reproductivo está estrechamente ligado al ciclo estacional del ambiente, permitiendo una sincronización periódica (Takemura et al., 2004; Wang et al., 2010). En teleósteos de regiones templadas, el fotoperiodo, como indicador primario, ejerce un papel fundamental en el control de los eventos reproductivos y la historia de vida en general (Sundby et al., 2016), mientras que la temperatura se considera un factor secundario (Migaud et al., 2010; Wang et al., 2010). En términos aplicados, el fotoperiodo se puede clasificar como "desencadenante", mientras que la temperatura sería un "regulador" (Kjesbu et al., 2010). En zonas tropicales y ecuatoriales, donde las fluctuaciones estacionales de fotoperiodo y temperatura son menos pronunciadas, los cambios regionales en el entorno, como las precipitaciones (Denusta et al., 2019; Karnatak et al., 2018), las mareas y el ciclo lunar, tienen un impacto mayor en la sincronización de los eventos reproductivos (Takemura et al., 2004; Shima et al., 2020), en contraste con las latitudes más altas donde se observan cambios más marcados en la duración del día (Sundby et al., 2016).

Además de los factores determinantes, existen factores moduladores que afinan la progresión y calidad reproductiva (Wang et al., 2010), como la temperatura en algunas especies, tanto templadas como tropicales (Pankhurst y King, 2010; Takemura et al., 2004). Es crucial señalar que las especies de latitudes altas no están más en riesgo bajo el cambio climático en comparación con las tropicales. De hecho, las especies tropicales ya operan en o cerca de su límite térmico máximo, con ventanas térmicas estrechas, pero capacidad de aclimatación rápida (Donelson et al., 2012). Mientras tanto, las especies de aguas templadas frías a menudo están en la fase de "ascenso" de su respuesta fisiológica esperada, mostrando una curva en forma de cúpula (Pörtner y Farrell, 2008), lo que sugiere que podrían beneficiarse reproductivamente de temperaturas aún más altas hasta alcanzar un óptimo (Kjesbu et al., 2010, 2014). De hecho, ciertas especies como la anjova (*Pomatomus saltatrix*, Linnaeus 1766) y el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua* L.) en el mar de Barents, parecen mostrar beneficios derivados del calentamiento del agua, como una posible expansión de su distribución y un incremento en la condición de los peces (Kjesbu et al., 2014; Villegas-Hernández et al., 2015).

Entre los procesos reproductivos influidos por la temperatura, la gametogénesis es particularmente interesante, ya que durante este proceso se producen los gametos y las etapas finales de la maduración de los ovocitos parecen ser altamente sensibles a la temperatura (Bobe, 2015; Tveiten et al., 2001; Zucchetta et al., 2012). La calidad de los gametos es un factor determinante del éxito en el desarrollo de la siguiente generación, debido a la capacidad combinada de espermatozoides y óvulos para producir descendencia viable (Bobe y Labbé, 2010). Por lo tanto, la comprensión del impacto del calentamiento del ambiente sobre la gametogénesis y sus consecuencias sobre la calidad de los gametos es de gran importancia para la ecología reproductiva, así como para la acuicultura. Sin embargo, si bien el rendimiento reproductivo es un atributo clave, debe tenerse en cuenta que las poblaciones podrían tener resultados negativos bajo el cambio climático por otras razones, como el desplazamiento hacia zonas de depredadores

importantes (Fossheim et al., 2015), las dificultades asociadas con los ciclos generacionales largos (menor posibilidad de adaptación), la especialización ecológica, la sobreexplotación (Dulvy et al., 2003; Hillebrand et al., 2018), y los cambios impulsados por la temperatura en el momento y la capacidad reproductiva (Alix et al., 2020), todas las cuales interactuaron con estas variables.

Espermatogénesis y homeostasis del nicho celular

La espermatogénesis es un proceso celular necesario para la formación de gametos masculinos a partir de células madres germinales (CMGs), abarca tres etapas fundamentales. Este proceso se inicia con una fase mitótica de proliferación y diferenciación, seguida por la meiosis, que resulta en espermátidas redondas y culmina con una tercera fase denominada espermiogénesis postmeiótica (Schulz et al., 2010). Durante la espermatogénesis las células germinales proliferan a través de sucesivas divisiones mitóticas sincrónicas, que darán lugar al inicio de la meiosis (**Figura 1**). Las CMGs, en la madurez, se dividen para formar otro tipo de espermatogonia tipo A1 (autorrenovación). Las espermatogonias A1 tiene tres opciones: puede formar otro espermatogonia A2-A3-A4 (auto-renovación); pueden sufrir muerte celular (apoptosis); o diferenciarse en el primer tipo de célula madre comprometida, la espermatogonia intermedia. Las espermatogonias intermedias están destinadas a convertirse en espermatozoides y se dividen mitóticamente una vez para formar las espermatogonias de tipo B. Estas células son las precursoras de los espermatoцитos y son las últimas células de la línea que sufren mitosis (La y Hobbs, 2019; Schulz et al., 2010). Se dividen una vez para generar los espermatoцитos primarios, las células que entran en meiosis.

Durante las divisiones de las espermatogonias, la citocinesis no se completa. Más bien, las células forman un sincitio en el que cada célula se comunica con las demás a través de puentes citoplasmáticos de aproximadamente 1 μm de diámetro (Dym y Fawcett 1971). Las divisiones

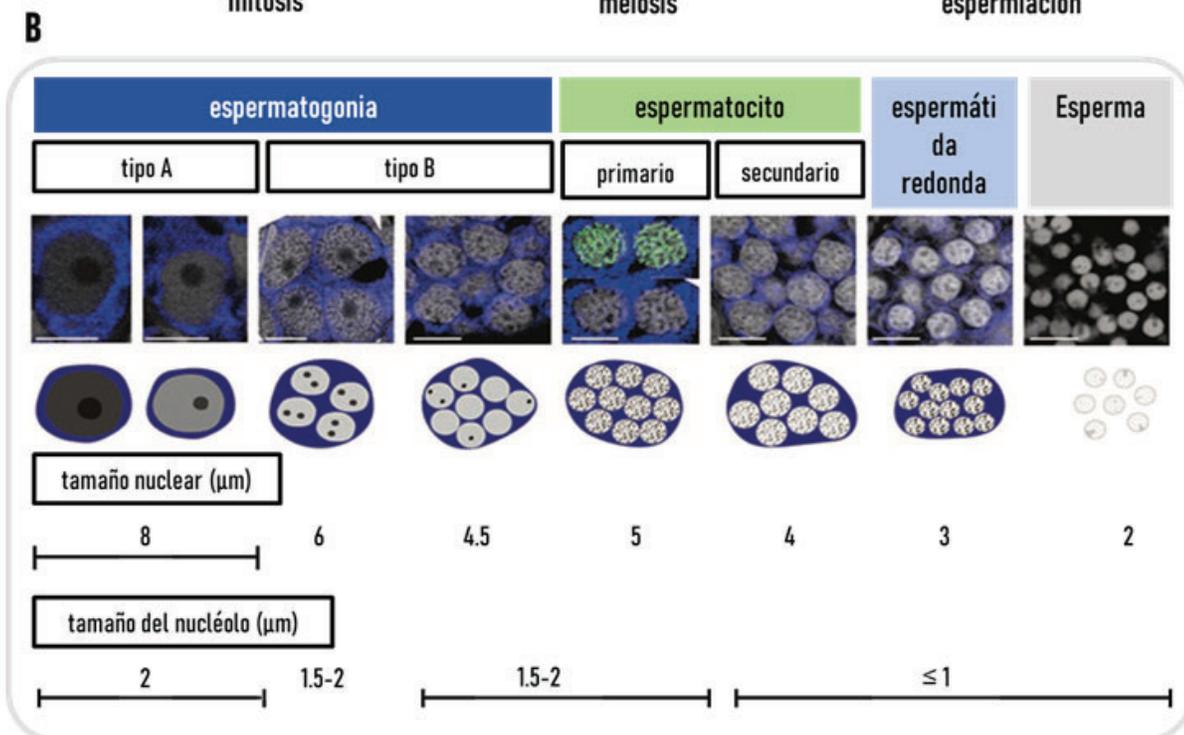
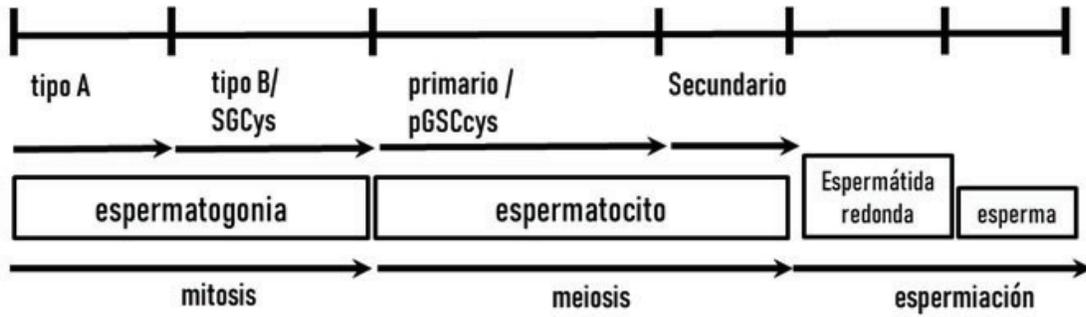
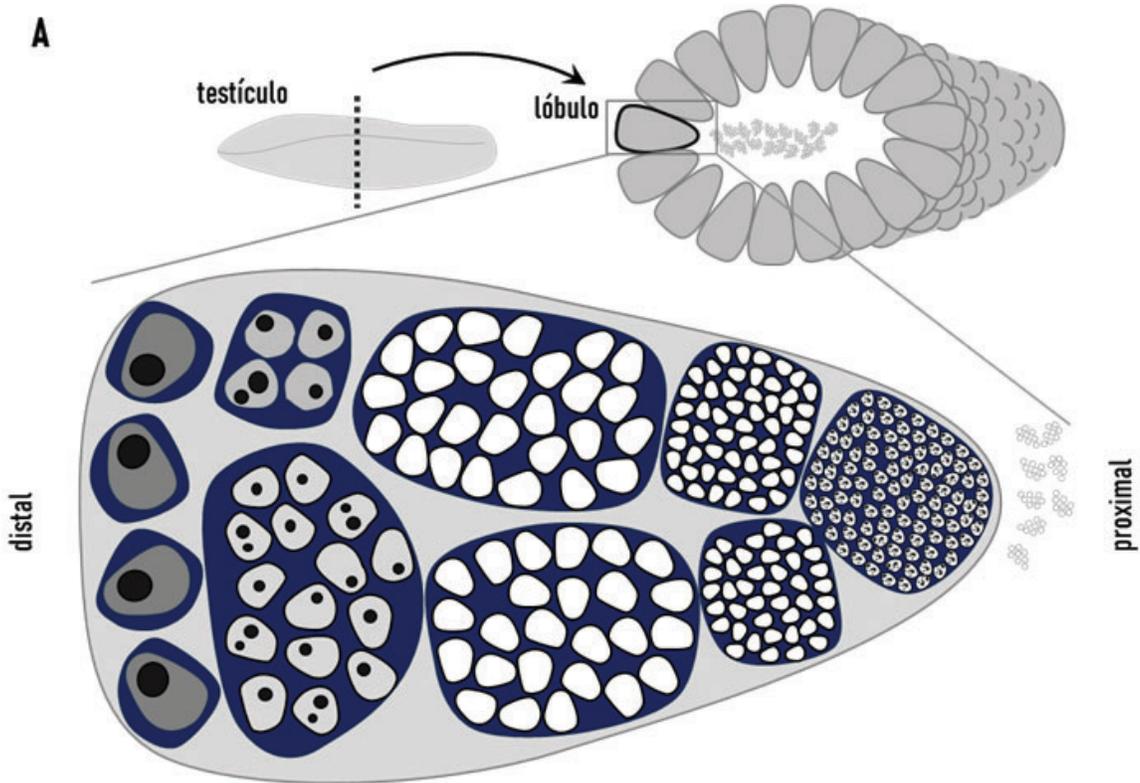
sucesivas producen clones de células interconectadas, y como los iones y las moléculas pasan fácilmente a través de estos puentes intercelulares, cada cohorte madura sincrónicamente. Durante este tiempo, el núcleo del espermatocito transcribe genes cuyos productos se utilizarán más tarde para formar el axonema y el acrosoma. Cada espermatocito primario sufre la primera división meiótica para dar lugar a un par de espermatocitos secundarios, que completan la segunda división de la meiosis. Las células haploides así formadas se denominan espermátidas, y siguen conectadas entre sí a través de sus puentes citoplasmáticos. Las espermátidas que están conectadas de esta manera tienen núcleos haploides, pero son funcionalmente poliploides, ya que un producto génico producido en una célula puede difundirse fácilmente en el citoplasma de sus vecinas (Braun et al. 1989).

Para mantener la espermatogénesis continua a lo largo de la vida reproductiva masculina, un microambiente especializado en los testículos, conocido como nicho de las células madre germinales (CMGs), regula diversas propiedades como la autorrenovación, la quiescencia, el tamaño y la capacidad de diferenciación y proliferación de las CMGs (Chiarini-Garcia et al., 2001; Di Persio et al., 2017; Kitadate y Kobayashi, 2010; Mäkelä y Hobbs, 2019; McIntyre y Nance, 2020; Nishimura et al., 2016; Nóbrega et al., 2010). Este nicho en la gónada se caracteriza por ser un microambiente en el cual residen las células madre germinales en conjunto con células progenitoras somáticas (CPSs), las cuales actúan como fuente de señalización extrínseca para que las CMGs mantengan su potencial de autorrenovación (Kitadate y Kobayashi, 2010). Por ejemplo, la falta de una regulación adecuada en la formación de los nichos da como resultado la degeneración del tejido o anomalías morfológicas similares a tumores (Calvi et al., 2003; Tanentzapf et al., 2007; Zhang et al., 2003). Además, el mantenimiento del número de células germinales se logra gracias a un equilibrio delicado entre la proliferación y la apoptosis, cuya regulación implica genes como *amh* (hormona antimülleriana) o *ndrg1b* (gen 1b regulado aguas abajo de *n-myc*), y *p53*, respectivamente (Arias Padilla et al., 2020; Hiroshi et al., 2003; Morinaga

et al., 2007; Rodríguez-Marí et al., 2010). Esta capacidad de los testículos para mantener la homeostasis en las CMGs y regular la decisión entre autorrenovación, diferenciación o apoptosis es esencial para su supervivencia de los individuos a condiciones adversas (La y Hobbs, 2019).

Uno de los nichos de células madre mejor caracterizados se encuentra en el testículo de *Drosophila*, en el que las CMGs son fácilmente identificables y las células del nicho son las encargadas de mantener la producción continua de espermatozoides. En la punta apical del testículo las CMGs se encuentran en íntimo contacto con células somáticas de nicho, o células centrales, que envían la señal de autorrenovación Unpaired (Upd), un ligando que activa la vía de señalización Jak/STAT en las CMGs vecinas (Hardy et al., 1979; Kiger et al., 2001; Tulina y Matunis, 2001). Cuando una CMG se divide, la hija que permanece en contacto con las células centrales mantiene la identidad de la célula madre, mientras que la hija que se desplaza del centro recibe una señal más débil e inicia la espermatogénesis. Es por estos trabajos principalmente en *Drosophila* que sabemos que las señales procedentes de microentornos reguladores (nichos) hacen que las células madre conserven su potencial de autorrenovación o adquieran un destino diferente, mediante la diferenciación. Este destino alternativo, que en el caso de las CMGs es la proliferación que dará inicio a la meiosis, está regulado por diferentes factores, muchos de ellos ambientales.

Figura 1: (A) Los testículos de los peces teleósteos, se componen de unidades llamadas lóbulos. La espermatogénesis procede del lado distal al proximal. (B) Características de las células germinales en cada etapa de diferenciación (barra, 5 μ m; blanco, DAPI; azul, OLVAS; verde, SYCP1; SGcys, cisto espermatozocito primario tipo B; pSCcys, quiste de espermatozocito primario).



Muchos factores ambientales afectan a la reproducción, incluyendo el comportamiento, la madurez sexual y la gametogénesis, a varios niveles (Munakata y Kobayashi, 2010; Tobarí y Tsutsui, 2019). Además como fue mencionado anteriormente, la temperatura, el fotoperíodo y la nutrición son factores bien conocidos que afectan a la reproducción (Shimizu et al., 2000; Sakae et al., 2020; Sakae y Tanaka, 2021). Sin embargo, la mayoría de los mecanismos que controlan la reproducción en respuesta a estos factores siguen sin estar bien caracterizados (Sumita et al., 2021). La temperatura es uno de los factores ambientales más relevantes que afecta directamente a la reproducción (Alix et al., 2020). Mientras que durante el desarrollo temprano la temperatura puede afectar el curso de la diferenciación gonadal, en las etapas adultas, el aumento de la temperatura puede influir en la calidad y cantidad de gametos en los testículos, comprometiendo así la espermatogénesis y, en última instancia, el éxito reproductivo (Blackshaw y Massey, 1978; Hayashi et al., 2010; Hutson et al., 2013; Mieusset y Bujan, 1995; Sarida et al., 2019; Setchell, 1998). Si bien en mamíferos se ha estudiado cómo la hipertermia compromete los diferentes tipos de células germinales (Carlsen, 2003; Hansen, 2009), principalmente con foco en la apoptosis (Lue et al., 1999), en animales poiquilotermos, esto toma una mayor relevancia. Este es el caso de los peces teleosteos, donde se ha observado que bajo exposición crónica a temperaturas crecientes solo quedan como remanente las células madre espermatogoniales (*spermatogonial stem cells* o SSCs), que tienen la capacidad de recuperar la línea germinal (Ito et al., 2008). Por ejemplo, la recuperación de la línea germinal a partir de unas cuantas células germinales se observó en el pez cebra después de un estrés apoptótico inducido por altas temperaturas (Yamamoto et al., 2024). Esta característica resistente que permite que la línea germinal de los peces supere un factor de estrés y la permanencia de las SSCs en los testículos nos llevó a pensar que la protección de las células germinales puede depender de un mecanismo celular que se activaría específicamente por señales ambientales.

Vía Notch

Se observó que una de las principales vías de señalización involucrada en la regulación de la proliferación y quiescencia de diferentes células madre (Blanpain et al., 2006; Conboy y Rando, 2002), incluidas las células germinales primordiales (CGP) (Garcia et al., 2013, 2014; Garcia y Hofmann, 2013; McIntyre y Nance, 2020), es la vía Notch. Esta es una vía de señalización yuxtacrina altamente conservada y está compuesta por cuatro receptores (Notch 1–4) que interactúan con sus ligandos, delta 1, 3–4, jagged 1–2 (**Figura 2**) (Bray, 2006; Henrique y Schweisguth, 2019). En la vía de señal canónica de Notch, después de unirse al ligando el receptor es activado por el complejo γ -secretasa, ocurriendo la proteólisis dentro del dominio transmembrana (Fortini, 2002; Selkoe y Kopan, 2003; Zhang et al., 2000). Después de la escisión, el ligando se traslada al núcleo donde se asocia con proteínas de unión al ADN para activar la transcripción de genes diana en cis, como *hes1* y *hes5* (Fischer y Gessler, 2007; Kageyama et al., 2007).

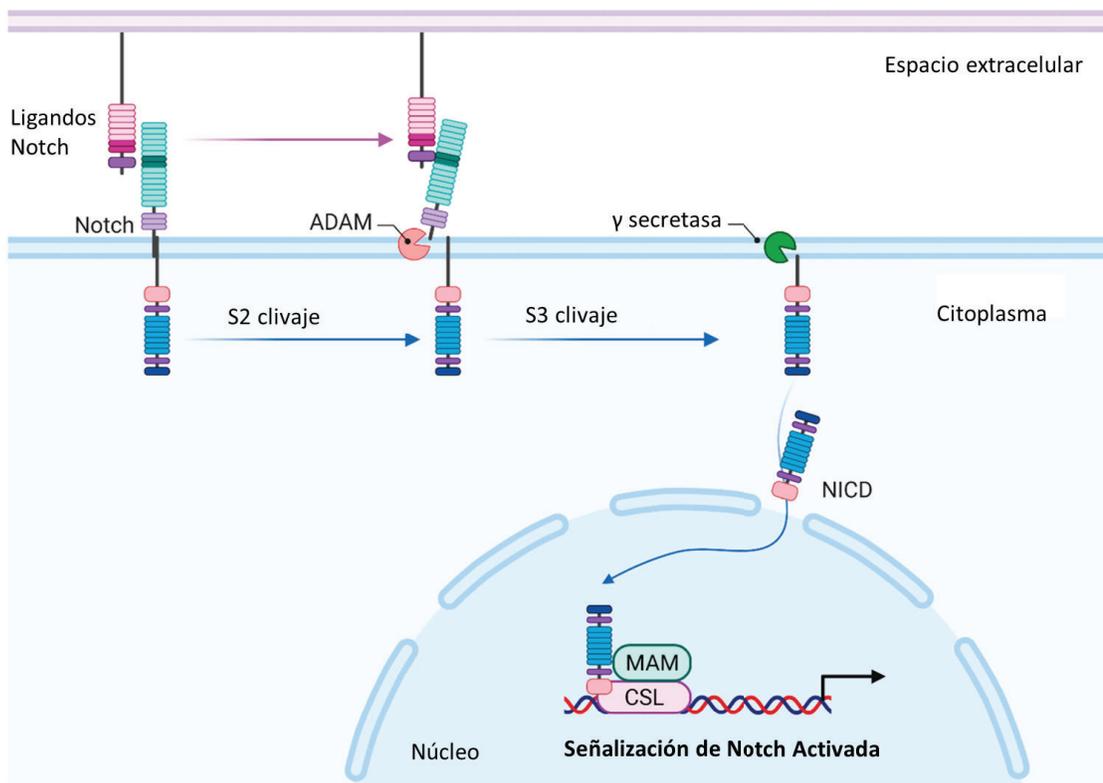


Figura 2: Una vista simplificada de la señalización canónica de Notch. Resumen de la vía de señalización central creada con BioRender.com. Los ligandos canónicos de Notch se unen a los receptores de Notch en los epidermal growth factor (EGF) repeats 11–12 (secciones verde oscuro). La escisión del receptor de Notch implica dos eventos de escisión proteolítica, el primero catalizado por las metaloproteasas ADAM en la región reguladora negativa (secciones moradas), el segundo por γ -secretasa. Esto libera el dominio intracelular de Notch (NICD). En el núcleo, NICD interactúa con la proteína de unión al ADN CBF1/Suppressor of Hairless/LAG1 (CSL; también conocida como RBPJ) y el coactivador Mastermind (MAM) para promover la transcripción génica. Modificado de O'Brien et al. (2022).

Notch en la conformación de nichos celulares

Con la imagen emergente de cómo la señalización de Notch da forma al comportamiento celular durante el desarrollo, hay un escenario que recibió poca atención: el mantenimiento del nicho de las células madre y, menos aún, su formación. Hasta ahora, se ha demostrado que el mantenimiento de múltiples tipos de células madre adultas en muchos organismos depende de la señalización de Notch, por ejemplo las células madre hematopoyéticas, cerebrales, mamarias y musculares adultas humanas (Carlson et al., 2009; Ables et al., 2011; Maillard, 2014; Chakrabarti et al., 2018). Sin embargo, lo más interesante es que la demostración de que la señalización de Notch desempeña un papel importante en la formación de todos los nichos de células madre, como los nichos ovárico, testicular e intestinal, principalmente se a caracterizados con mayor detalle en *Drosophila* (Ward et al., 2006; Song et al., 2007; Mathur et al., 2010; Okegbe y DiNardo, 2011). El papel de la señalización de Notch en los nichos de células madre adultas ha sido demostrado en múltiples sistemas, incluidos modelos de mamíferos. En comparación con la sencilla organización de la vía Delta-Notch en moscas y *Drosophila*, los mamíferos tienen cinco

ligandos Notch (similares a Delta 1, 3 y 4; y Jagged 1 y 2) y cuatro receptores Notch (Bray, 2006). Por ejemplo, se ha propuesto que las células madre neurales (por *Neural Stem Cell*, NSC) inactivas produzcan sus propias células de nicho utilizando el ligando Notch tipo Delta 1 (Dll1) (Kawaguchi et al., 2013). La proteína Dll1 se induce en NSCs activadas y se segrega en una célula hija durante la mitosis. Las células que expresan Dll1 residen muy cerca de las NSCs inactivas, lo que permite que una señal de retroalimentación mantenga las células madre neurales inactivas en la zona subventricular del ratón adulto, mientras se mantiene un equilibrio entre las NSCs y su progenie. Hay datos que sugieren un mecanismo de retroalimentación adicional a través de la señalización de EGFR en las células de la progenie que causa la reducción de la señalización de Notch en las células no autónomas en las NSCs y la inducción de neurogénesis en la progenie (Aguirre et al., 2010). Como resultado, la cantidad de NSCs disminuye, lo que resulta en una reducción del conjunto de células madre que tiene efectos homeostáticos y de alteración de la composición en el tejido en general.

Vía Notch y espermatogénesis

A pesar de los numerosos estudios sobre la vía Notch en la regulación de la proliferación celular, se sabe poco sobre su participación en la regulación de la proliferación de células germinales bajo un factor de estrés ambiental como la temperatura. Se ha demostrado que Pen-2, (la subunidad catalítica del complejo γ -secretasa), desempeña una función importante en la supervivencia de las células, protegiéndose de la apoptosis (dos Santos et al., 2008). La eliminación selectiva de *pen-2* en el desarrollo de embriones en el pez cebra resultó en una fuerte inducción de la cascada de apoptosis dependiente de p53 en todo el animal (Campbell et al., 2006). Aunque la función de Pen-2 ha sido muy estudiada en cerebro (Fortini, 2002; Xia, 2019) y cáncer (Nowell y Radtke, 2017), su participación en la gónada no ha sido del todo aclarada. Al respecto, en un estudio

previo se sugirió que Pen-2, la subunidad catalítica del complejo γ -secretasa, actúa como un gen antiapoptótico, protegiendo a las espermatogonias de la temperatura durante la diferenciación testicular en peces (Fernandino et al., 2011). En dicho estudio se observó que en gónadas de juveniles de pejerrey *Odontesthes bonariensis* sometidos a altas temperaturas el gen *pen-2*, y por lo tanto la vía de Notch, se encontraba regulado positivamente durante el proceso de masculinización inducido por altas temperaturas, en el cual se observaron altos niveles de apoptosis en la gónada (Fernandino et al., 2011). Al igual que en los peces teleósteos, también se ha establecido que las células germinales de los mamíferos experimentan apoptosis a través de la cascada p53 durante la exposición a altas temperaturas (Hiroshi et al., 2003). Sin embargo, al igual que otras células madre (Wabik y Jones, 2015), las células germinales tienen un mecanismo de protección para evitar el daño inducido por la apoptosis al entrar en un estado transitorio del ciclo celular llamado quiescencia, donde la células permanecen en la fase G0. Por lo tanto, las células germinales deben conservar la información y totipotencia adecuada, para luego recuperar la reproducción (Kadekar y Roy, 2019).

Con base en estos antecedentes nos planteamos evaluar la participación de la vía Notch en el mecanismo de protección de las células germinales contra el efecto del estrés térmico en el pez medaka *Oryzias latipes*. En este pez, el nicho ha sido bien caracterizado, donde las SSCs están rodeadas directamente por células de Sertoli y sufren divisiones asincrónicas (Nakamura et al., 2012; Nishimura et al., 2016). Además la disminución del número de células germinales debido a la exposición a altas temperaturas ha sido bien informada (Selim et al., 2009), lo que convierte a esta especie en un excelente modelo para estudiar los efectos de la temperatura en el mantenimiento de las CMGs.

Medaka como modelo para estudiar la espermatogénesis

El medaka (o medaka japonés, *Oryzias latipes*) tiene una amplia distribución en Asia, especialmente en Japón, principalmente en pequeños estanques y arrozales (Kinoshita et al. 2012). El medaka puede reproducirse durante todo el año (Shima y Mitani 2004), pero tiene un periodo de desove limitado en estado salvaje. Se necesitan más de 12 horas de luz diurna y una temperatura del agua superior a 13 °C para que se produzcan la oogénesis y la espermatogénesis. En estas condiciones los peces empiezan a aparearse y las hembras desovan los huevos. Estas condiciones climáticas coinciden con las de la primavera y el verano japoneses. En realidad, la combinación de un ciclo de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad (14L-10D) y temperaturas de 25-28°C (que coinciden con las de principios de verano en Japón) y suficiente alimento proporciona las mejores condiciones para el desove de los huevos en la naturaleza. En primavera, en estado salvaje, cuando la temperatura del agua es inferior a 25 °C, las larvas eclosionan en 10 o más días. Las larvas alcanzan la madurez a principios del verano. Se aparean y desovan huevos hasta que las horas de luz se hacen más cortas que las de oscuridad (de finales de verano a otoño). Un pequeño número de la siguiente generación sobrevive al invierno y un número menor puede sobrevivir dos inviernos (Hilgers et al., 2019). Se considera que la vida media en libertad es de un año, ya que la depredación y/o los cambios estacionales del entorno son las principales causas de muerte de los peces medaka en libertad. Egami informó de que la vida media es inferior a tres años y la vida máxima es de aproximadamente cinco años en condiciones experimentales (Egami 1971).

La mayoría de los teleósteos tienen un par de gónadas, que comprenden un lóbulo izquierdo y un lóbulo derecho. Sin embargo, en el medaka los lóbulos están fusionados y se sitúan en la región dorsal de la cavidad abdominal posterior. El testículo aparece como una larga estructura blanca, que a veces se encuentra incrustado en cuerpos grasos bien desarrollados (tejido adiposo) compuestos de numerosas partículas blancas, y la superficie del testículo está

cubierta de mesorquio. Un vaso sanguíneo relativamente grande recorre el centro de la superficie ventral del testículo. El testículo posterior conecta con un conducto eferente que desemboca en la cloaca. El conducto eferente está situado en el centro y discurre longitudinalmente; del conducto irradian túbulos seminíferos cortos hacia las regiones periféricas. Los espermatozoides se almacenan en este conducto hasta la eyaculación. Las espermatogonias, fuente primaria de gametos, se localiza en las regiones más periféricas de cada túbulo. Las células germinales sometidas a gametogénesis se dividen sincrónicamente como un quiste rodeado de células de Sertoli y se desplazan hacia un conducto eferente a medida que avanza la gametogénesis (**Figura 3**). Así pues, la espermiogénesis se produce en las proximidades del conducto eferente (Murata et al., 2019).

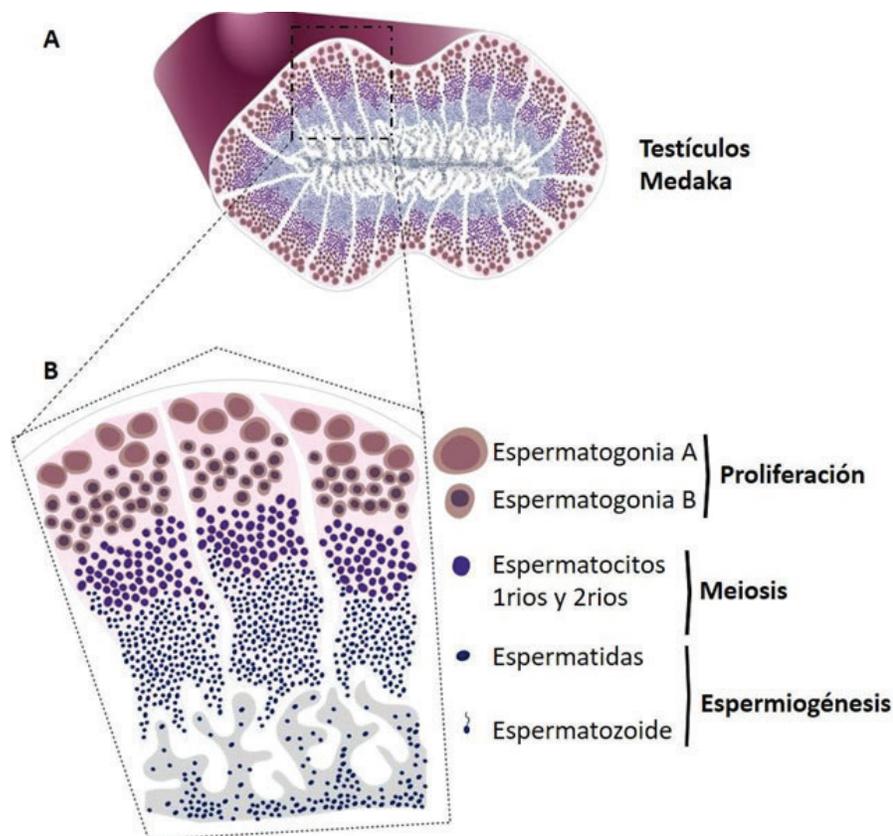


Figura 3: Representación esquemática de la estructura de testículos en medaka. (A) Testículos restringidos de medaka con presencia de las espermatogonias en la región distal. (B) Composición

de cada túbulo testicular, en la parte distal de cada túbulo encontramos los cistos formados por células de Sertoli que contienen las espermatogonias tipo A, las cuales se dividen por proliferación tipo I para autorrenovarse, y por proliferación tipo II cística para diferenciarse a espermatogonias tipo B. Las espermatogonias tipo B entran a meiosis dando lugar a los espermatocitos primarios (1rios), y una vez avanzada la meiosis se da lugar a los espermatocitos secundarios (2rios), que rápidamente avanzan dando lugar a las espermatidas. Las espermatidas se transforman en espermatozoides, durante la espermiogénesis. Esquema modificado de Iwai et al., (2006).

En el tipo de testículo espermatogónico restringido, como el de *O. latipes*, las espermatogonias de tipo A se localizan en la región periférica en el lobulillo, región germinal en el testículo, y existen muchos espermatocistos hacia el centro donde se localiza el conducto eferente. El espermatocisto es un quiste de células de Sertoli que contiene espermatogonias de tipo B, espermatocitos primarios y espermatocitos secundarios. Se trata de una estructura común en los testículos de los vertebrados de aparición evolutiva más temprana (Pudney 1993). A medida que la espermatogénesis progresa de forma sincrónica en cada espermatocito, el propio espermatocito se desplaza hacia el centro del testículo (Grier 1981), lo que da lugar a la localización de los estadios más tempranos de las células germinales en la periferia y los estadios más tardíos hacia el centro. Cuando se completa la espermatogénesis, los espermatozoides de cada espermatocito se liberan en el conducto eferente y contribuyen a la reproducción diaria (Iwasaki et al., 2009).

PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La vía Notch participa en la protección de las espermatogonias frente al estrés por temperatura.

Objetivo general

Evaluar la vía de señalización Notch en la protección de las espermatogonias durante un evento de estrés por temperatura.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la temperatura en la línea germinal en el pez *Oryzias latipes*.
- Establecer la región del testículo donde la vía Notch se activa por un estrés térmico.
- Evaluar el rol de la vía Notch en la supervivencia de las espermatogonias del tipo A.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los animales y diseño experimental.

Todos los experimentos realizados en esta tesis fueron llevados a cabo con la línea hi-medaka (ID: MT835) de la especie *Oryzias latipes*, perteneciente al orden Beloniformes y familia Adrianichthyidae. Esta línea fue suministrada por el Proyecto Nacional de Recursos Biológicos de Japón (National BioResource Project: NBRP; www.shigen.nig.ac.jp/medaka/). Todos los peces fueron mantenidos y alimentados según las condiciones y protocolos estándar establecidos para Medaka por Kinoshita et al. (2012). Los peces se manipularon de acuerdo con el manejo de animales de laboratorio (Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, <http://www.ufaw.org.uk>) y reglamento institucional interno (CICUAE UNSAM 17/21).

Experimentos *in vivo* con altas temperaturas

Brevemente, 35 peces macho fueron criados en un tanque de 10 L a 25 °C ±1 bajo un fotoperíodo de 14 h de luz/10 h de oscuridad durante 2 semanas. Posteriormente, para el experimento de estrés por calor, la temperatura se elevó a 33 °C ±1 durante 30 días. El grupo control se mantuvo en condiciones normales de la sala de cría a 25 °C ±1. Para el muestreo, a 5 peces de cada grupo se les extrajo el testículo a los 3, 10 y 30 días tras el inicio del experimento para su posterior análisis. Los peces fueron anestesiados mediante choque térmico en hielo, seguido de un corte en la notocorda antes de proceder con la disección, la cual se llevó a cabo utilizando un estereoscopio marca Nikon modelo SMZ745, empleando tijeras y pinzas de disección.

Experimentos *ex vivo* con DAPT

Para llevar a cabo experimentos *ex vivo* con las secciones testiculares, los peces fueron anestesiados con un shock de frío en hielo y luego sacrificados. Seguidamente se diseccionan los testículos bajo el microscopio estereoscópico, utilizando pinzas y tijeras estériles. Las gónadas se extrajeron y se colocaron en solución salina tampón fosfato (PBS) 1 Molar con penicilina estreptomina 1x (Gibco; Thermo Fisher Scientific™, Waltham). Luego se enjuagaron, posteriormente se cortaron en trozos de aproximadamente 1 mm y se dejaron en medio L15 (Gibco) con antibiótico durante la noche a 25°C. Luego se colocaron de 2 a 4 trozos de testículo en cada pocillo con 1 ml de medio con DAPT (Selleckchem, Houston), un inhibidor de la γ -secretasa que inhibe indirectamente a Notch impidiendo el clivaje de γ -secretasa en concentraciones de 12,5 μ M y 25 μ M. El control se incubó con DMSO (Sigma-Aldrich; Merck, Rahway), a una concentración final de 0,1%, que se utilizó como diluyente de DAPT. La incubación fue realizada durante 24 h en estufa (Thermo Fisher Scientific™) a 25 °C (NT) o 33 °C (HT) y 5% CO².

Extracción total de ARN

Se extrajo la mitad del testículo de los machos para analizar la expresión génica. La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando 300 μ L de TRIzol® (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific™), se siguió las instrucciones del fabricante. El ARN de cada muestra se utilizó (500 ng) para la síntesis de ADNc utilizando la enzima SuperScript II (Invitrogen).

PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)

Para llevar a cabo los ensayos de RT-qPCR se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen (**Tabla 1**) usando el software Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl>). Previo al uso de cada

oligonucleótido se validó su especificidad y se determinó su eficiencia de amplificación ($100 \pm 10\%$, $R2 > 0.98$). Las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 96 pocillos en el termociclador de tiempo real Agilent MX3005P Multiplex qPCR (Stratagene). Cada reacción fue llevada a cabo con 2x Fast Start SYBR Green Universal Master Mix con ROX (Roche), empleando condiciones estándar de amplificación con un ciclo inicial de 1 minuto a 95°C , seguido de 45 ciclos de 95°C por 10 segundos y 60°C por 30 segundos. Para cada amplificación se realizaron dos réplicas técnicas, y al final de cada amplificación se analizaron las curvas de melting para verificar la amplificación específica de cada producto, descartando aquellas muestras que presentaran algún desvío de la normalidad. En cada experimento se incluyeron controles negativos, sin ADNc, para confirmar la ausencia de productos amplificables en el medio de la reacción. Finalmente, el método de cuantificación empleado fue el delta-delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), utilizando como gen de referencia el gen de la proteína ribosomal L7 (*rpl7*) (Castañeda Cortés et al. 2019; Zhang y Hu, 2007) y el factor de elongación alfa (*ef-1a*) (Arias Padilla et al. 2021).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en técnicas de cuantificación y síntesis de sondas de esta tesis.

Nombre	Número de acceso a ENSEMBL	Secuencia oligonucleótidos (5' - 3')	Experimento
<i>oct4</i>	ENSORLG00000010471.2	Fw: GGCCCCGGCTTTCTTTG Rv: CTCCGCTTCCTCTCCTGGTG	WMISH
<i>amh</i>	NM_001104728.1	Fw:ACGCCACTTCTGCTTTTCAC Rv: AAGTCCACAACATCCGCTTG	

<i>notch1a</i>	ENSORLT00000006535	Fw: AAGGTGTGGAGGTGAACCAG Rv: GTCGGTACAGGTTGCTCCAT	RT-qPCR
<i>notch3</i>	ENSORLG00000005980	Fw: ATCGCAAAGCCAATGACAGC Rv: ATGGGGTTTGTGCAATTGGC	
<i>dll4</i>	ENSORLG00000016743	Fw: AGCAAGCCTTGTACAACGG Rv: TCAAACCCATTTGCGCACAC	
<i>jag1a</i>	ENSORLG00000012175	Fw: AACATCGATGACTGCAGCAC Rv: TGCACGTTGCTTCATCACAC	
<i>jag1b</i>	ENSORLG00000000972	Fw: TGTCAACGCCAAATCATGCC Rv: ACCGTTACCAAATCCTTGC	
<i>jag2a</i>	ENSORLG00000017877	Fw: TTGCAAAGAAGGCTGGGAAG Rv: TGCACATTCACAGCGAAACC	
<i>jag2b</i>	ENSORLG00000017729	Fw: TGTGTGAACGCTAACGCTTG Rv: TTGCATGTTGCCCCATTCTG	
<i>oct4</i>	ENSORLG00000010471.2	Fw: TTGAGCGCGTATTTGCTGAC Rv: ACTTGATGAAGTACGCCTCCCAG	
<i>p53</i>	NM_001104742.1	Fw: TGCCAGCTTGCAAAAACCAG Rv: AGAGTCCTCGTTTTGGTGGTG	
<i>rpl7</i>	ENSORLG00000007967.2	Fw: CGCCAGATCTTCAACGGTGTAT Rv: AGGCTCAGCAATCCTCAGCAT	

<i>bcl2</i>	XM_004079356.2	Fw: TATCGCGTTCTTCGAGTTCG Rv: TCAATCCAGCTGTTGAGAGGTC
<i>pen2</i>	ENSDARG00000068698	Fw: ATTACTTGGGAGGCTTTGCG Rv: TGCAGCTGTTTCAAGTAAGC
<i>hes1</i>	XM_004074234.2	Fw: GGGACTTTTTGCCAGTTTGA Rv: TTTGTCTGGGAGTTGTGTTCA

Histología, cuantificación celular e IF

Se tomaron muestras de la mitad restante del testículo para histología convencional e inmunofluorescencia (IF). Los tejidos se fijaron primero en solución de Bouin y se procesaron de acuerdo con protocolos estándar para la preparación de secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina. Luego, se seccionaron transversalmente utilizando un micrótopo DM 2125RT (Leica, Wetzlar, Alemania) de 4 a 5 μm de espesor. Para la cuantificación celular, seguimos nuestro trabajo anterior (Arias Padilla et al. 2021). Brevemente, se contaron tres secciones gonadales para cada testículo ($n = 3-4$ por punto de muestra), estableciendo la distancia entre cada sección para evitar contar la misma célula dos veces. Para reducir errores técnicos, cada sección se contó dos veces en todos los experimentos. Luego, las imágenes se analizaron utilizando el software FIJI (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Las células individuales se contaron manualmente con el complemento Cell Counter para FIJI. Las espermatogonias se contaron según la descripción de Iwasaki et al. (2009) y las células espermatogénicas siguiendo a Schulz et al. (2010). Todas las fotografías de la sección se tomaron con una cámara adosada a un microscopio Eclipse E600 (Nikon, Tokio).

Para las IFs las secciones se lavaron con PBS 0,1 M (pH 7,4) y se bloquearon en PBS 0,1 M que contenía albúmina sérica bovina al 0,5 % (Sigma-Aldrich) y Triton X100 al 0,5 % durante 60 minutos antes de la incubación durante la noche a 4 °C con anticuerpo primario, anticuerpo

anti-Pen-2 (1:200, conejo, LS-C135520, LSBio, Seattle). También se realizó un control negativo para comprobar la especificidad sin el anticuerpo primario. Después de la incubación, las secciones se lavaron dos veces en PBS y se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante 90 minutos con anticuerpos secundarios IgG anti-conejo conjugados con Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific™, A-11008) en una dilución de 1:2000 en PBS. Después de la incubación, las secciones se enjuagaron dos veces con PBS y se montaron con medio de montaje Fluoromount (Sigma-Aldrich) que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 5µg/ ml, Life Technologies; Thermo Fisher Scientific™).

Ensayo de TUNEL

Los explantos testiculares fueron fijados en solución de Bouin (Formol, Ácido Pírico y Ácido Acético), embebidos en parafina y cortados sagitalmente cada 5 µm en micrótopo de deslizamiento (Leica) ubicándolos en portaobjetos tratados con TESPA (Sigma- Aldrich). Tras desparafinar los cortes se procedió con la técnica de TUNEL (del inglés, TdT- mediated dUTP Nick End Labeling, TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transferase), la cual marca el fragmento terminal de los ácidos nucleicos resultado del corte de ADN generado durante la apoptosis (en otras palabras: el marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa), para lo cual se utilizó el kit de detección de muerte celular *in situ* con fluoresceína (Roche, Cell Death Detection Kit, Fluorescein) siguiendo las recomendaciones del fabricante, permeabilizando con PBS-T (PBS pH 7.4, TritónX100 0,1% y citrato de sodio 0.1%). La fluorescencia se observó con un microscopio Nikon Eclipse E600. Para la cuantificación de células TUNEL positivas, se cuantificaron 2 portaobjetos por testículo para cada individuo (n = 3 por puntos de muestra).

Hibridación *in situ* en testículos

Se realizaron las hibridaciones *in situ* (HIS) según el protocolo descrito por Nakamura et al. (2006). Para construir la sonda de *oct4* (marcador de células troncales, también conocido como pou5f1; Wang et al., 2011, del inglés Octamer-Binding Protein 4), se emplearon oligonucleótidos específicos (**Tabla 1**) para amplificarlos por medio de PCR, clonarlos en el vector pGEM®-T (Promega), y finalmente llevar a cabo la transcripción *in vitro*. Para sintetizar las sondas de ARN se procedió a la linealización de 10 µg de cada plásmido con enzimas de restricción específicas. La linealización se realizó hacia el extremo 5' de la secuencia del gen con la finalidad de sintetizar una sonda de ARN antisentido. Tras purificar el ADN linealizado se procedió a realizar la transcripción *in vitro* utilizando la ARN polimerasa T7. El marcaje de la sonda del gen *oct4* (del inglés Octamer-Binding Protein 4) se realizó con una mezcla de ribonucleótidos con uracilos marcados con digoxigenina (DIG labeling mix, Roche).

Para llevar a cabo la HIS se emplearon explantos testiculares de tratamiento *ex vivo*, los cuales fueron fijados en RNase-free paraformaldehído (PFA) at 4 °C, PFA 4% durante 16 horas a 4°C. Se utilizaron los explantos testiculares y se siguió el protocolo de HIS empleando la permeabilización con metanol creciente (25, 50, 75 y 100% 1X PBS DEPC), por 16 horas, después se lleva de la misma forma a PBSw-DEPC (PBS preparado con agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) más Tween 20 0,1%), hibridando a 66°C durante 16 horas, lavando e incubando con anticuerpo anti-DIG-Alkaline Phosphatase (Roche), para su posterior detección en presencia de los sustratos NBT/BCIP (tetrazolio nitroazul/5-bromo-4-cloro-3-idolil fosfato).

Análisis estadístico

Los análisis histológicos se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM) para variables continuas y como porcentajes para variables categóricas. El cambio de veces y el

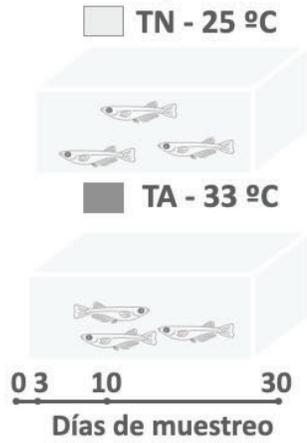
análisis estadístico de las cuantificaciones de RT-qPCR se realizaron utilizando la media geométrica en el software FgStatistics, según el método comparativo de expresiones genéticas (Pfaff 2001). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Prism 9 (GraphPad Software, San Diego). Las variables continuas se compararon mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para comparar la media de cada grupo. Las variables continuas se compararon entre dos grupos mediante la prueba t-Student de dos colas no apareadas. Todas las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

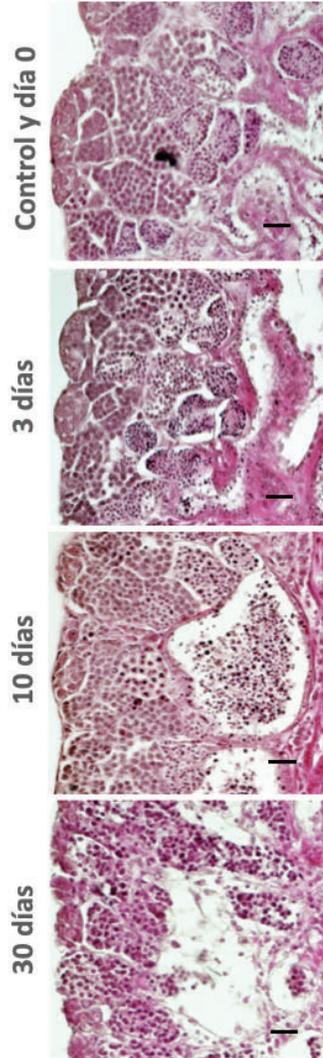
Inhibición de la espermatogénesis en machos criados a alta temperatura.

En este primer paso se analizó el proceso de espermatogénesis *in vivo* en adultos, manteniendo a los machos adultos a temperatura normal (TN — 25 °C) o alta (TA — 33 °C) durante 30 días (**Figura 4A**). Inicialmente, la respuesta de medaka al tratamiento térmico se analizó mediante histología de los testículos. Se observó que el número de espermatogonias (CG: espermatogonias indiferenciadas tipo A y espermatogonias diferenciadas tipo A como SGa; espermatogonias tipo B como SGb) así como el número de quistes con CG no cambiaron por el efecto del tratamiento (**Figuras 4B, C**). Además, la inhibición de la proliferación de SGa y SGb fue respaldada por la regulación positiva de *amh*, un conocido regulador de la proliferación de células germinales (Morinaga et al. 2007; Ohta et al. 2003; Rodríguez-Marí et al. 2010), a los 10 días de tratamiento térmico (tres veces en comparación con TN) (**Figura 5A**). Por otro lado, observamos un aumento en el número de espermatocitos (espermatocitos primarios leptoténicos/cigoténicos; espermatocitos primarios paquiténicos; espermatocitos diploténicos/metafase I) a los 10 días, con una reducción del número a los 30 días de tratamiento térmico (**Figuras 4A, C**).

A. Diseño experimental



B. Histología



C. Cuantificación de la Espermatogénesis

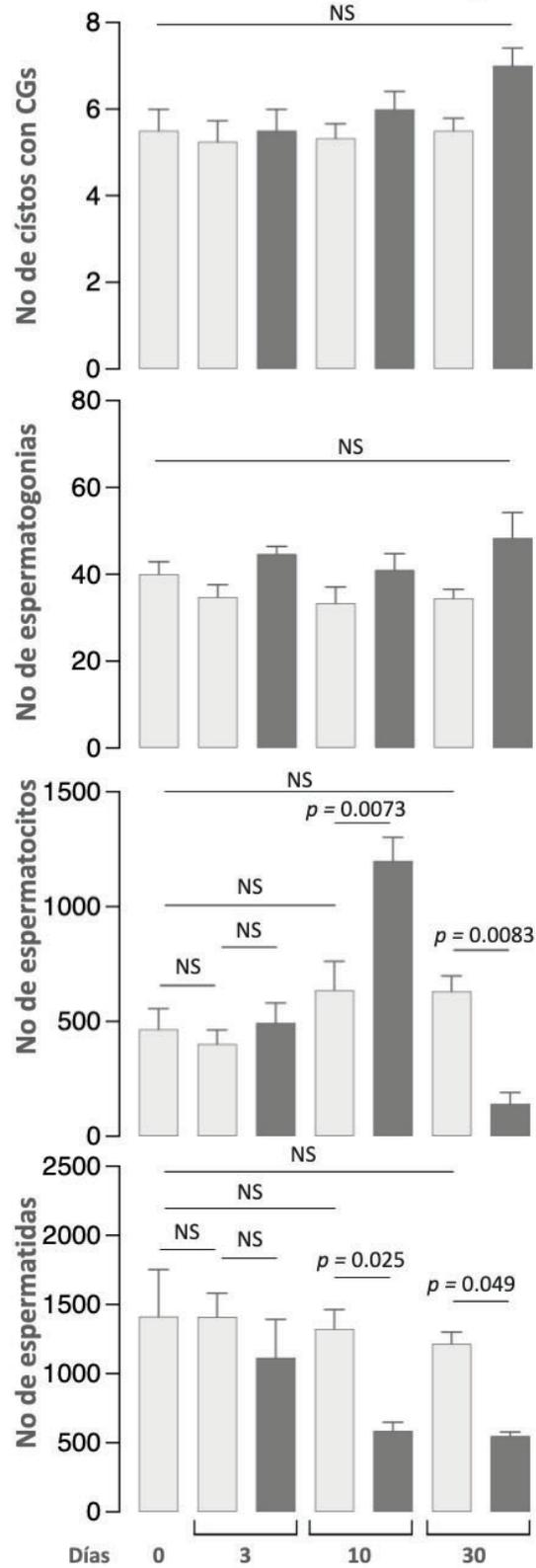


Figura 4. Inhibición de la espermatogénesis en machos criados a alta temperatura. **(A)** Diseño experimental: Se analizó la espermatogénesis en adultos criados a temperatura normal (TN - 25° C, gris claro) y alta (TA - 33° C, gris oscuro) durante 30 días. **(B)** Histología: Secciones transversales de testículo teñidas con hematoxilina y eosina (HyE) de machos adultos criados a TA durante 0 (y control), 3, 10 y 30 días. **(C)** Cuantificación de células de espermatogénesis: Número de espermatogonias (SGs: espermatogonias indiferenciadas tipo A y diferenciadas tipo A como SGa; espermatogonias tipo B como SGb), número de quistes con SGs, número de espermatocitos (espermatocitos primarios leptoténicos/zygoténicos; espermatocitos primarios paquiténicos; espermatocitos diploténicos/metafase I) y número de espermátidas (espermátidas tempranas, intermedias y finales). Las variables continuas se compararon entre dos grupos mediante la prueba t de Student no apareada de dos colas. La barra de escala representa 20 μ m. Las cuantificaciones de las células espermatogénicas se compararon mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para comparar la media de cada columna con la media de las demás columnas. Todas las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$. NS, no significativo estadísticamente.

Además, el gen *ndrg1b*, caracterizado como un regulador negativo de la proliferación de células germinales quísticas (Arias Padilla et al. 2021), se reguló negativamente a los 10 días de tratamiento térmico (**Figura 5B**), lo que se correlaciona con el aumento del número de espermatocitos. En este sentido, el marcador de espermatogénesis *sycp3*, proteína 3 del complejo sinaptonémico que se ha asociado con la metafase I de la espermatogénesis en medaka (Iwai et al. 2006; Yuan et al. 2000), se reguló a la baja (**Figura 5C**), en concordancia con la reducción del número de espermátidas (espermátidas tempranas, intermedias y finales) observadas a los 10 días de tratamiento térmico (**Figuras 4B, C, D**).

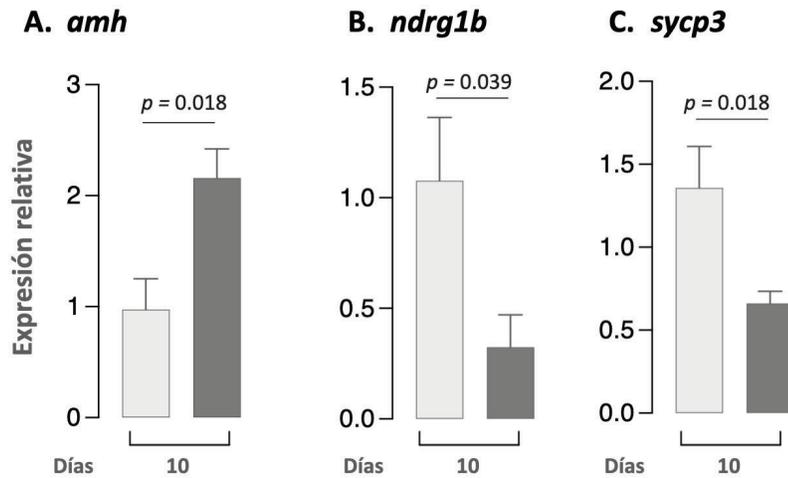


Figura 5. qPCR: Cuantificación de la abundancia de los transcritos **(A)** *amh*, **(B)** *ndrg1b* y **(C)** *sycp3* a los 10 días en testículos de machos criados en TN y TA. Para la cuantificación de la abundancia de transcritos, los valores de *amh*, *ndrg1b* y *sycp3* se normalizaron frente a la media geométrica de los genes de referencia *rpl7* y *ef-1a*. Las variables continuas se compararon entre dos grupos mediante la prueba t de Student no apareada de dos colas. Todas las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Apoptosis de la línea germinal de los testículos a alta temperatura.

Para poder determinar el destino de la pérdida de células germinales en respuesta al aumento de la temperatura, se evaluó la aparición de apoptosis en el tratamiento térmico. La vía apoptótica, cuantificada por la abundancia de transcritos de *p53* y *bcl2*, mostró una regulación positiva en los testículos TA a los 10 días (0,5- veces de *p53* y dos veces de *bcl2*) en relación con TN (**Figura 6A**), lo que sugiere que el tratamiento térmico indujo la apoptosis. Finalmente, el análisis de apoptosis en la línea germinal mediante el ensayo TUNEL mostró un mayor número de células TUNEL positivas a los 10 días de tratamiento (40 veces; **Figura 6B, C**). Además, a los 30 días, el

número de células TUNEL positivas fue mayor en comparación con el grupo de control (80 veces; **Figura 6B-C**). Este mayor número de células apoptóticas se encontró en la región medular del testículo, mientras que no se encontraron espermatogonias apoptóticas. Se observaron células en la porción distal del túbulo (**Figura 6C**), donde se localizan los SGa (ver más abajo).

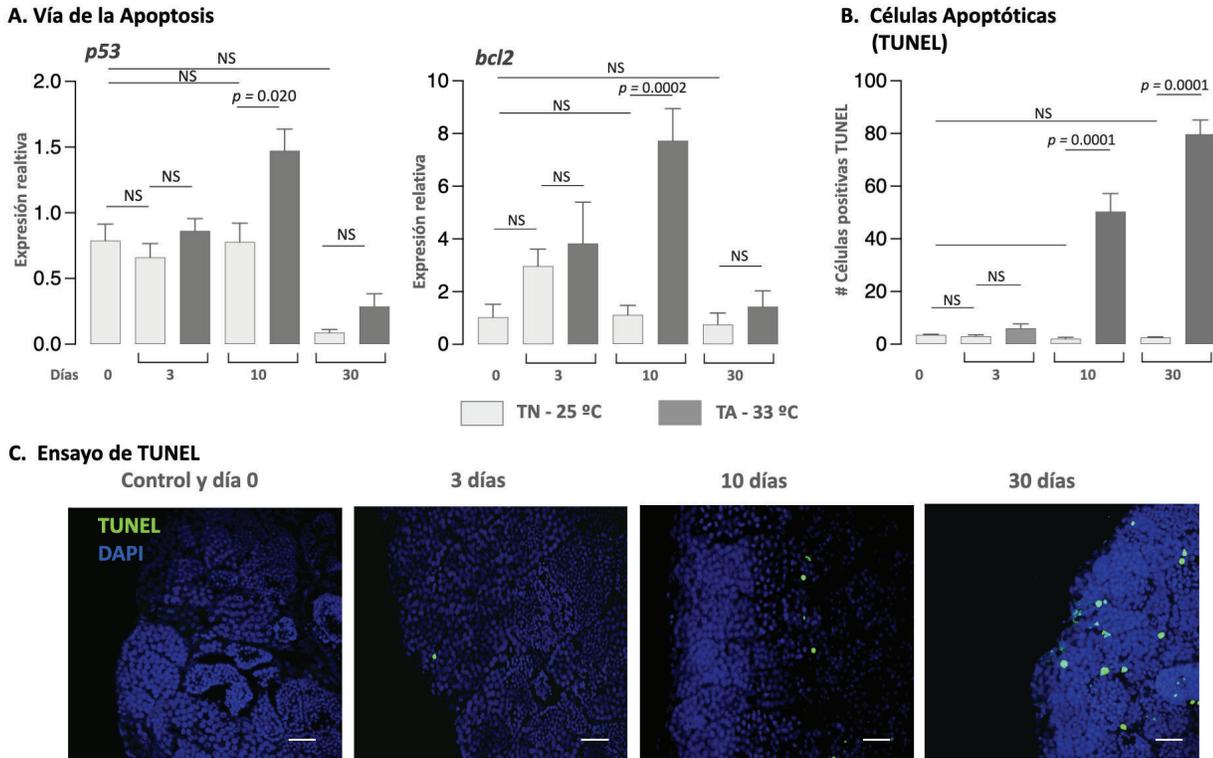


Figura 6. Las altas temperaturas inducen la apoptosis en la línea germinal de los testículos. **(A)** Vía apoptótica: Cuantificación de la abundancia de transcritos de *p53* y *bcl2* a los 0, 3, 10 y 30 días en testículos de machos criados a temperatura normal (TN - 25° C, gris claro) y alta (TA - 33° C, gris oscuro). **(B)** Células apoptóticas: Cuantificación de células apoptóticas mediante ensayo TUNEL a diferentes tiempos de muestreo y tratamiento térmico. **(C)** Ensayo TUNEL: Sección transversal del testículo con ensayo TUNEL mostrando células apoptóticas (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul) a los 0 (y control), 3, 10 y 30 días (D). Para la cuantificación de la abundancia de transcritos, los valores de *p53* y *bcl2* se normalizaron frente a la media geométrica

de los genes de referencia *rpl7* y *ef-1a*. Las cuantificaciones de células apoptóticas se compararon mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para comparar la media de cada columna con la media de todas las demás columnas. Los valores p se indican cuando las diferencias entre tratamientos en el mismo día de muestreo difieren significativamente ($P < 0,05$). NS, no significativo estadísticamente. La barra de escala representa 20 μm .

Identificación de Pen-2 en testículos adultos

Para comprender mejor los reguladores responsables del mantenimiento del número de células germinales (CG) durante el tratamiento térmico, se evaluó la vía de Notch, una de las principales rutas de señalización implicadas en la regulación de la proliferación y la quiescencia de diversas células madre (Blanpain et al. 2006; Conboy y Rando 2002). Como primer paso, se caracterizó la presencia de Pen-2, la subunidad catalítica del complejo γ -secretasa, en testículos adultos mantenidos en condiciones control (TN). Se observaron células positivas para Pen-2 en la porción distal del lóbulo testicular, que incluye la región germinal donde se localizan las SSC (Figuras 7A, B). Para verificar la co-localización de Pen-2 con las células germinales activas (SGa), se realizó un ensayo de hibridación in situ (HIS) utilizando una ribosonda contra *oct-4*. Se detectaron células inmunorreactivas para Pen-2 (IrPen-2) en células somáticas que rodean a las CGa (células positivas para *oct4*) (Figuras 7C, D), lo que sugiere que Pen-2 se expresa predominantemente en células de Sertoli.

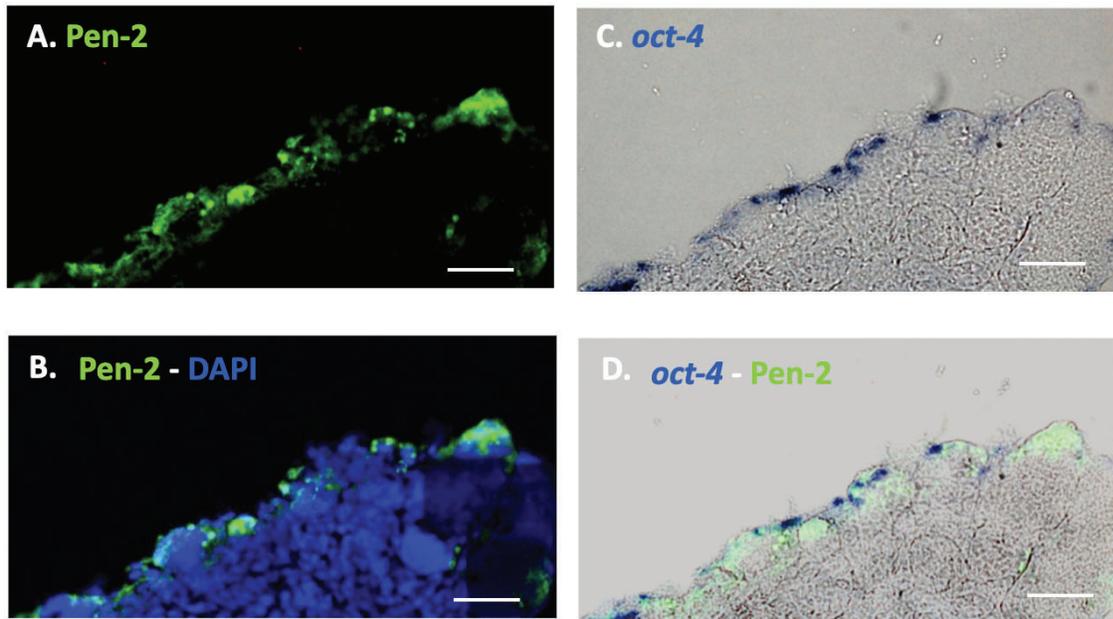


Figura 7. Pen-2 se regula al alza durante el tratamiento térmico en machos. **(A, B)** Secciones transversales de la porción distal del lóbulo testicular en machos adultos criados en TN, con expresión de Pen-2 (verde, inmunofluorescencia, IF) y núcleos teñidos con DAPI (azul). **(C, D)** Co-localización de Pen-2 (verde, IF) con *oct-4* (azul, hibridación *in situ*). Las barras de escala representan 20 μm .

Regulación positiva de Pen-2 en los testículos a alta temperatura.

Tras caracterizar la localización de Pen-2 en el testículo, el siguiente paso fue analizar su expresión durante el tratamiento térmico. Luego se analizó la expresión de *pen-2*/Pen-2 (transcripción y proteína) en un tratamiento para adultos *in vivo*, manteniendo a los machos adultos en TN y TA durante 30 días (**Figura 8A**). En primer lugar, cuantificamos la abundancia de transcripciones de genes relacionados con la vía de Notch, como *pen-2* y *hes-1* (un conocido

efector de Notch) (Henrique y Schweisguth 2019). En el tratamiento térmico, ambos genes estaban regulados positivamente en 3 (*pen2* 1,5 veces y *hes1* 2,5) y 10 días (*pen2* y *hes1* el doble en TA respecto a TN) de tratamiento, no mostrándose diferencias al final del experimento (30 días) respecto a TN (**Figuras 8A, B**). Además, no se observaron diferencias en la abundancia de transcripciones de *pen-2* y *hes1* en TN entre los días de muestreo (**Figuras 8A, B**).

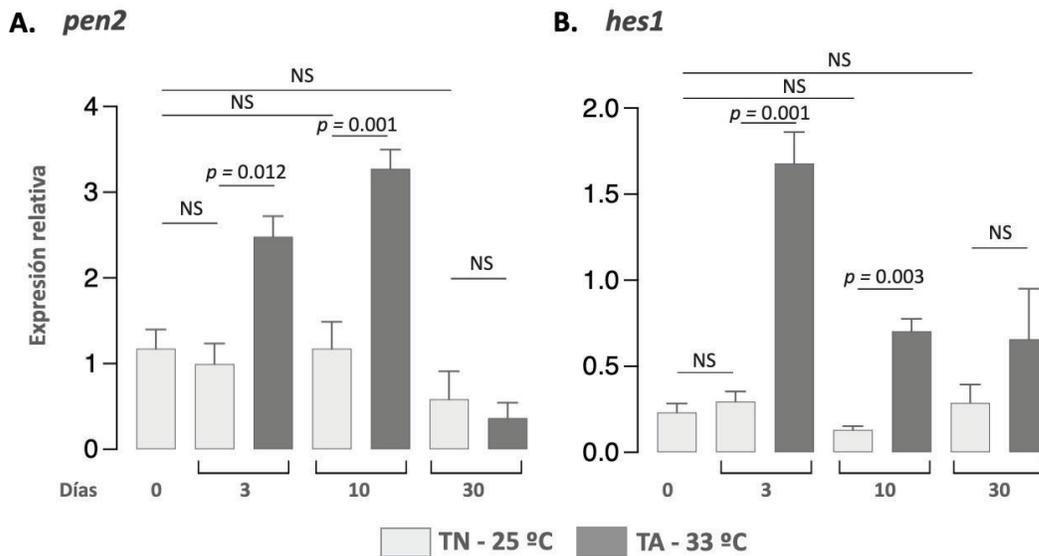


Figura 8. Vía Notch: Niveles de abundancia de transcripción de **(A)** *pen-2* y **(B)** *hes1* a los 0, 3, 10 y 30 días de tratamiento. La cuantificación de la abundancia de transcritos se realizó mediante el método de la media geométrica y los valores de *pen-2* y *hes1* se normalizaron frente a la media geométrica de los genes de referencia *rpl7* y *ef-1a*. Se indican los valores p cuando la abundancia de transcritos entre tratamientos en el mismo día de muestreo difiere significativamente ($P < 0,05$). NS, no estadísticamente significativo.

Además, se caracterizó la localización del Pen-2 en los testículos de peces criados a alta temperatura (**Figuras 9A-D**). Al comienzo del tratamiento (TN - 0 días), Pen-2 mostró expresión en

las células somáticas que rodean las SGa de la porción distal del lóbulo y en la región medular del testículo (**Figuras 9A, A'**). Bajo tratamiento a alta temperatura, la expresión de Pen-2 se limitó a la porción distal del lóbulo, donde se localizan los SGa (**Figuras 9B – D, 9B' – D'**).

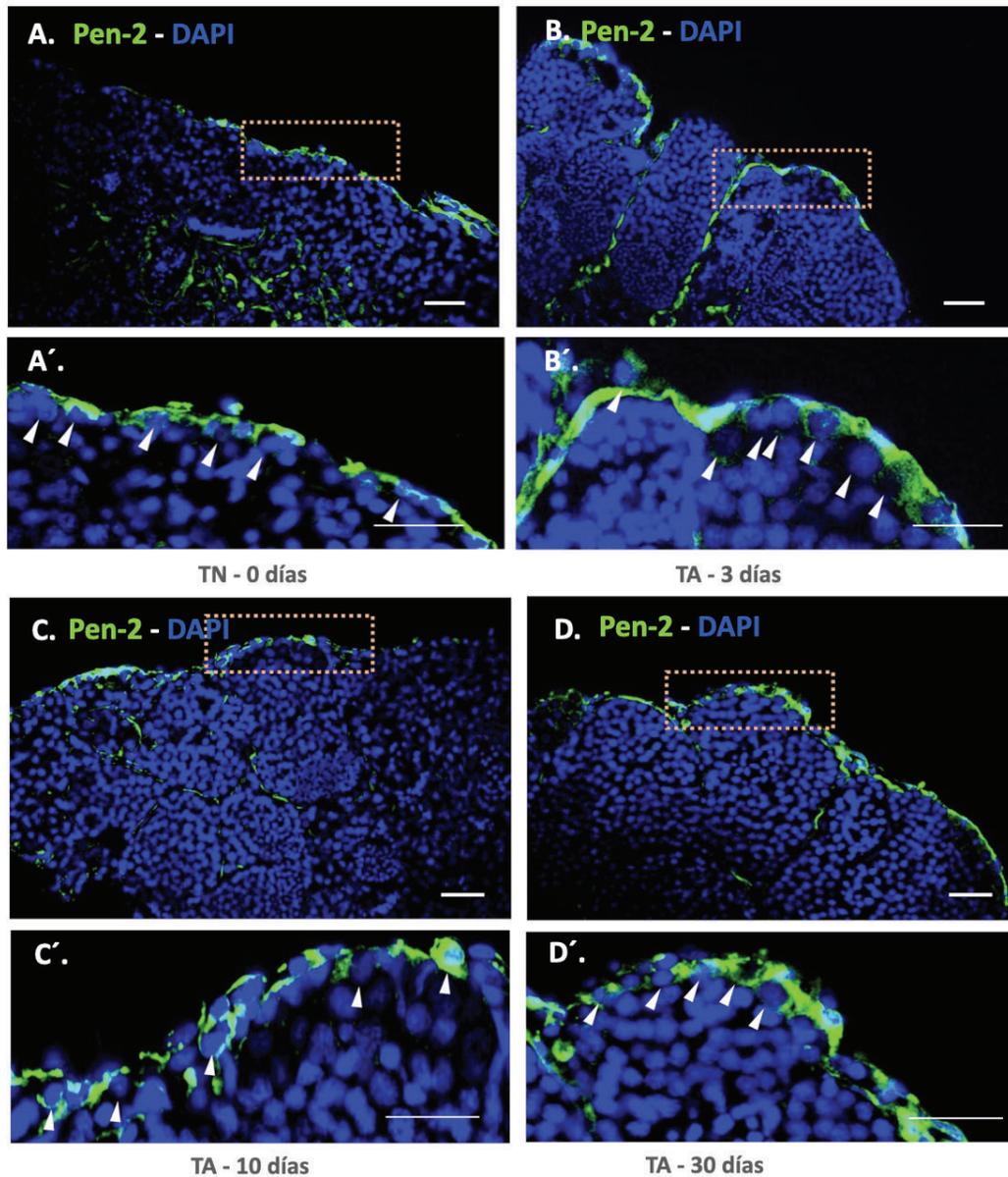


Figura 9. IF de Pen-2 (verde) en testículos de machos criados en TA a los 0 (**A**), 3 (**B**), 10 (**C**) y 30 (**D**) días de tratamiento térmico, y núcleos teñidos con DAPI (azul). Ampliación de cada testículo

(línea naranja punteada) a diferentes tiempos de muestreo a los 0 (**A'**), 3 (**B'**), 10 (**C'**) y 30 (**D'**) días de tratamiento térmico. La SGa se indica con una punta de flecha (**C'-D'**). Las barras de escala representan 20 μm .

Activación de la vía Notch en testículos bajo tratamiento a alta temperatura

Teniendo en cuenta la regulación positiva de *Pen-2/pen-2* y *hes1*, dos actores clave en la vía Notch, en testículos mantenidos a alta temperatura, se midieron los niveles de transcripción de ligandos y receptores de esta vía a los 10 días de tratamiento. La transcripción abundante de los receptores *notch-1a* y *notch3* (**Fig. 4A, B**), así como los ligandos *dll4*, *jag1a*, *jag1b* y *jag2* (**Figuras 10C-F**), se reguló positivamente a alta temperatura en comparación con el control. Por el contrario, *jag2b* no mostró ninguna diferencia entre TN y TA a los 10 días del tratamiento (**Figura 10G**). Esta regulación positiva de receptores y ligandos tras el tratamiento con temperatura respalda la activación de la vía Notch en los testículos sometidos a altas temperaturas.

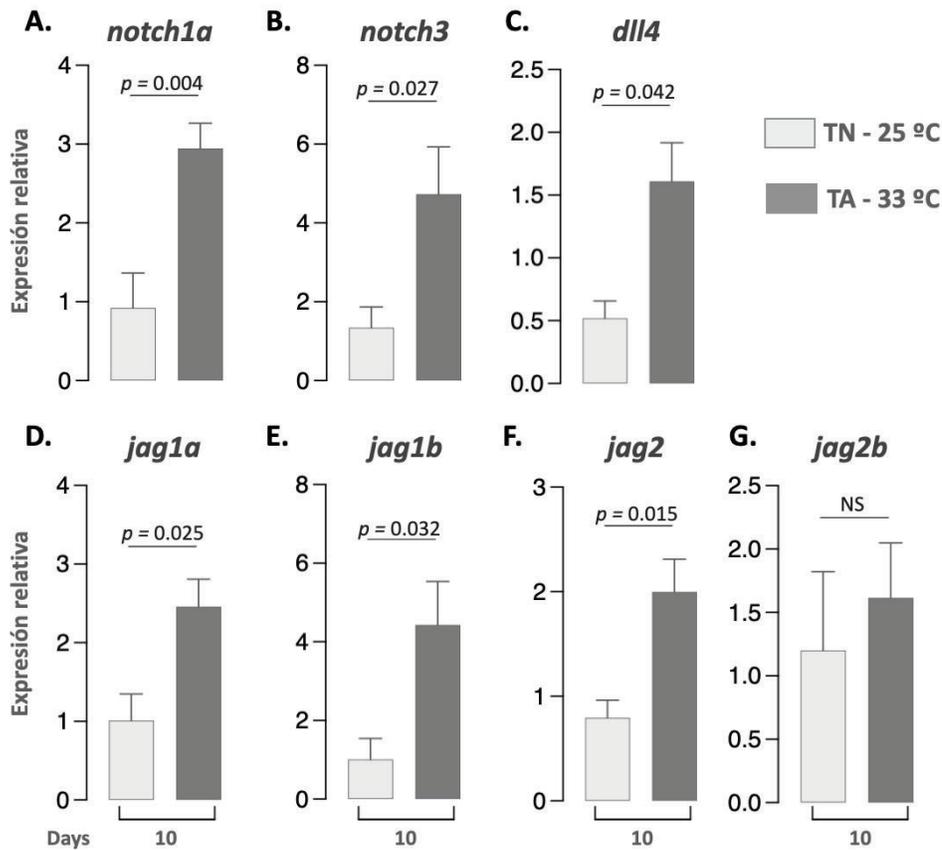


Figura 10. La vía Notch se regula al alza en los testículos a los 10 días de tratamiento térmico. Cuantificación de la transcripción de diferentes receptores de la vía Notch (*notch1a*, 3; **A-B**) y ligandos (*dll4*, *jag1a-b*, *jag2-2b*; **C-G**) a los 10 días en testículos de machos criados a temperatura normal (TN - 25° C, gris claro) y alta (TA - 33° C, gris oscuro). La cuantificación de la abundancia de transcritos se realizó mediante el método de la media geométrica y los valores de *notch1a*, 3, *dll4*, *jag1a-b* y *jag2-2b* se normalizaron frente a la media geométrica de los genes de referencia *rpl7* y *ef-1a*. Los valores p se indican cuando la abundancia de transcritos entre tratamientos en el mismo día de muestreo difiere significativamente ($P < 0,05$).

Inhibición de la vía Notch *ex vivo* en explantes de testículos sometidos a altas temperaturas

Basándonos en la regulación positiva de la vía Notch y la expresión restringida de Pen-2 en la región germinal del lóbulo distal, nuestro siguiente paso fue inhibir esta vía bajo un tratamiento a alta temperatura. Dada la complejidad de la vía de Notch y la forma en que afecta el destino de muchos tipos de células en diferentes tejidos (Campbell et al. 2006), se utilizó un enfoque *ex vivo* con explantes de testículos para analizar el papel protector de esta señalización intercelular. Inicialmente, se indujo apoptosis a partir de 3 h de exposición, con una regulación positiva en **p53** (**Figura 11A**). Además, no se observaron diferencias en la transcripción de *p53* entre las 3, 12 y 24 h de exposición a alta temperatura, llevando esto último al siguiente experimento *ex vivo*. Además, una respuesta dependiente de la dosis mostró que las condiciones más altas para bloquear la acción de Notch oscilaron entre 12,5 (regulación negativa moderada de *hes1*) y 25 μ M (alta inhibición de *hes1*) de DAPT (**Figura 11B**).

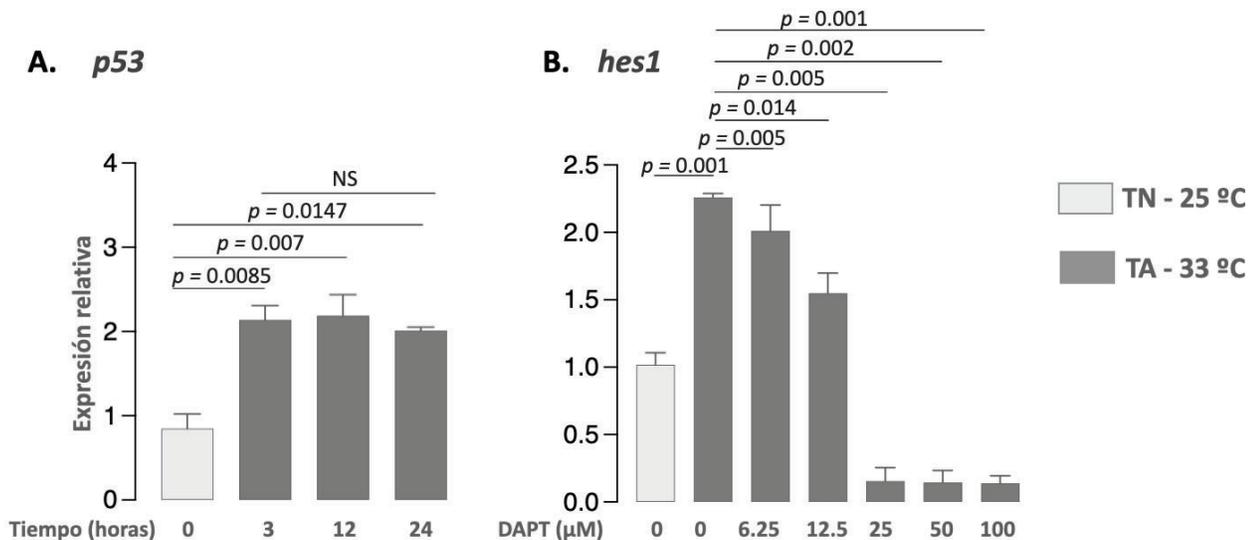


Figura 11. Optimización del tiempo y la dosis para el experimento *ex vivo*. **(A)** Curva de exposición temporal de la abundancia del transcrito de *p53* en explantes de testículo incubados a temperatura control (TN - 25° C, gris claro) y alta (TA - 33° C, gris oscuro), con muestreo a las 0, 3, 12 y 24

horas. **(B)** Respuesta a dosis de DAPT: Niveles de abundancia de transcripción de *hes1* (genes diana cis de la vía Notch) en explantes de testículo adulto incubados durante 24 horas a 0, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 μ M de DAPT (inhibidor de γ -secretasa). La cuantificación de la abundancia de transcritos se realizó mediante el método de la media geométrica y los valores de *p53* y *hes1* se normalizaron frente a la media geométrica de los genes de referencia *rpl7* y *ef-1a*. Los valores p se indican cuando la abundancia de transcritos entre tratamientos en el mismo día de muestreo difiere significativamente ($P < 0,05$).

Finalmente, en el experimento *ex vivo* con los explantes de testículos **(Figura 12A)**, como habíamos observado previamente, *hes1* aumenta su expresión a alta temperatura. Sin embargo, cuando los explantes testiculares sometidos a alta temperatura se tratan con el inhibidor de la vía de Notch, el DAPT, se observó una pérdida de la regulación positiva de *hes1* **(Figura 12B)**, lo que muestra que se inhibió la respuesta de la vía de Notch. Además, la expresión del marcador de células madre *oct-4* solo se vio afectada por el tratamiento con temperatura, mostrando una regulación positiva **(Figura 12C)**. Curiosamente, en la temperatura con el tratamiento DAPT se observó una reducción de estos niveles en los explantes testiculares, presentando niveles similares al tratamiento control. Esto sugiere una reducción de SGa y un efecto protector de Notch sobre el destino de las células germinales bajo estrés térmico.

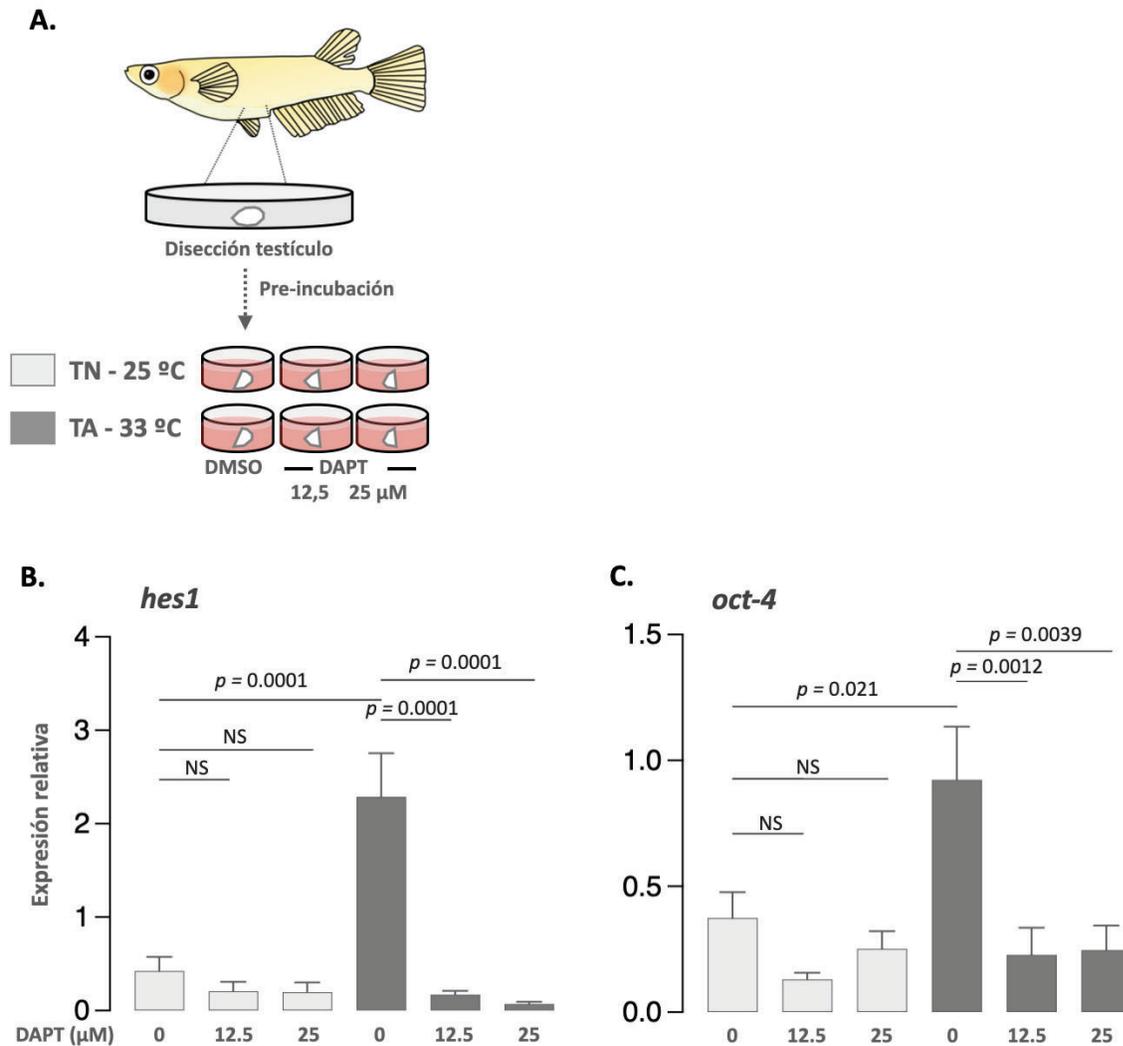


Figura 12. La vía Notch protege a la espermatogonia tipo A de la pérdida inducida por el calor. **(A)** Diseño experimental del enfoque *ex vivo*, en el que se incubaron explantes de testículo adulto durante 24 horas a temperatura control (TN - 25° C, gris claro) y alta (TA - 33° C, gris oscuro) con DAPT (inhibidor de γ -secretasa; 12,5 y 25 μM) por triplicado. **(B-C)** Niveles de abundancia de transcripción de *hes1* **(B)**, genes diana cis de la vía Notch) y *oct-4* **(C)**, gen marcador del estado del tallo) en diferentes tratamientos. La cuantificación de la abundancia de transcritos se realizó mediante el método de la media geométrica y los valores de *hes1* y *oct-4* se normalizaron frente a

la media geométrica de los genes de referencia *rpl7* y *ef-1a*. Los valores p se indican cuando la abundancia de transcritos entre tratamientos en el mismo día de muestreo difiere significativamente ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

En los sistemas multicelulares, incluidos los vertebrados, las células germinales son el origen de nuevos individuos y la fuerza impulsora de la diversidad genética y por lo tanto, de la evolución. Esta notable capacidad de las células germinales ha inspirado a muchos investigadores a realizar enormes esfuerzos en estudiar los mecanismos que subyacen al desarrollo de las mismas utilizando una amplia variedad de organismos modelo. El órgano donde se van a desarrollar las células germinales es la gónada (ovario y testículos), lugar donde estas células adquieren características específicas del sexo biológico durante el desarrollo gonadal. Esto constituye un proceso excepcional, complejo y de varios pasos, que incluye la migración de células germinales primordiales (PGCs, del inglés *primordial germ cells*) hasta alcanzar el primordio gonadal. Tras este paso, las PGCs adquieren competencia para gametogénesis dando lugar a las células madres germinales embrionarias (CMGEs) de carácter pluripotencial, seguido de una proliferación mitótica-cística, proliferación, diferenciación y finalmente inicio de la meiosis (Tanaka, 2016; Zhang et al., 2016; Arias Padilla et al., 2021).

Ciertas características de los ciclos celulares mitótico y meiótico son universales. Durante el ciclo celular mitótico, el genoma se replica durante la fase S, los cromosomas duplicados se segregan unos de otros durante la fase M y luego se incorporan en dos hijas diploides. La fase S va precedida de G1, una etapa en la que se ejercen los controles clave del desarrollo, y va seguida de G2, una etapa caracterizada por el crecimiento y la preparación para la fase M. En los animales, las PGCs proliferan mediante el ciclo celular mitótico en los embriones, y las CMGs adultas dependen del ciclo mitótico para autorrenovarse (Kimble, 2011). Antes del inicio de la meiosis, las CMGs proliferan por mitosis sincrónica, sucesiva e incompleta. Este tipo de proliferación mitótica genera grupos celulares interconectados por puentes celulares conocidos como cistos, que están rodeados de células somáticas. Por ejemplo, en *Drosophila* las CMGEs experimentan cuatro rondas de divisiones mitóticas sincrónicas, justo antes de entrar en meiosis,

dando lugar a cistos de 16 células, las cuales formarán el almacén celular para la formación de gametos (Hinnant et al., 2017). Tal es así que después de varias rondas de división mitótica, las CMGEs ingresan a la meiosis para convertirse finalmente en ovocitos o espermatozoides (Matova y Cooley 2001; Lei et al., 2013; Tanaka, 2016; Arias Padilla et al., 2021). La sostenibilidad de la espermatogénesis, y por ende del éxito reproductivo, se basa principalmente en la capacidad de las células madre espermatogoniales (SSCs) de decidir entre estos dos tipos de división: la autorrenovación para mantener el número adecuado basal de células madre o la división diferenciadora que dará inicio a la meiosis para la producción continua de espermatozoos.

Para que ocurra normalmente la espermatogénesis es necesaria una homeostasis en el testículo, la cual puede verse afectada por perturbadores externos, como agentes químicos o físicos (Delbès et al., 2022). Entre los factores estresantes que afectan la reproducción, el aumento de la temperatura es especialmente relevante debido al cambio climático actual (Hou, et al. 2015; Alix et al., 2020). A la luz de la actual crisis climática, una cuestión clave y oportuna a considerar es cómo la temperatura afecta a la reproducción. Varias líneas de evidencia indican que la fertilidad masculina se ve afectada negativamente por el aumento de las temperaturas ambientales en una amplia gama de organismos, incluyendo plantas, corales, insectos y vertebrados (Walsh et al., 2019; González- Tokman et al., 2020; Kumar et al., 2021; Mishra, 2021). Los peces por ejemplo, al tener una capacidad limitada para termorregular son especialmente susceptibles al cambio climático, sobre todo al aumento de las temperaturas agravado por la pérdida de hábitats de refugio (Vagner et al., 2019; Wang et al., 2010; Kjesbu et al., 2014). En este contexto, el presente estudio demostró que la exposición a altas temperaturas en machos adultos de medaka induce la interrupción de la espermatogénesis, lo cual afectaría negativamente el éxito reproductivo.

Nuestros datos de la inhibición de la progresión de la espermatogénesis por hipertermia se encuentran en concordancia con experimentos previos en mamíferos, en donde el aumento de la

temperatura compromete los diferentes tipos de células germinales (Carlsen, 2003; Hansen, 2009). Por ejemplo en humanos un episodio febril durante el período postmeiótico de la espermatogénesis (espermiogénesis) afecta negativamente la concentración, la morfología y la motilidad de los espermatozoides (Carlsen, 2003). Resultados similares fueron reportados en niños que presentan criptorquidia o los testículos no descendidos, que es la anomalía genital más frecuente en los varones. El riesgo de infertilidad en la edad adulta es más significativo en pacientes con testículos no descendidos bilaterales (Chung et al., 2015). Aproximadamente el 10% de los varones infértiles tienen antecedentes de criptorquidia y orquidopexia (Robin et al., 2010). La azoospermia es evidente en el 13% de las criptorquidias unilaterales y aumenta hasta el 89% en las criptorquidias bilaterales no tratadas (Urry et al., 1994). En el caso de los peces teleósteos la exposición crónica a hipertermia produce la pérdida de la línea germinal, con excepción de las SSCs, que tienen la capacidad de recuperar la línea germinal una vez que los parámetros físicos vuelven a las condiciones normales de la especie (Ito et al., 2008). Sin embargo, no se habían descrito los estadios espermatogoniales en donde este fenómeno ocurre en este grupo de vertebrados. En el presente trabajo observamos que la exposición de adultos machos de medaka a hipertermia produce una detención inicial en la metafase I con una pérdida final de células espermatogénicas, a excepción de los GCs. Nuestras observaciones, al igual que las realizadas en otras especies de vertebrados, soportan la capacidad de las CMGs de mantenerse en un estado de quiescencia, frenando la progresión de la espermatogénesis, y por lo tanto protegiéndose de esta forma de la apoptosis.

Aunque el aumento de las temperaturas promueve la espermatogénesis mediante la diferenciación de las espermatogonias (Alvarenga y França 2009), la persistencia prolongada a altas temperaturas causa una reducción en la línea celular espermatogénica debido a un aumento en la apoptosis en la mayoría de las células del testículo (Ito et al. 2008b; Rockett et al. 2001). Llamativamente, las únicas células que resisten este estrés físico son las espermatogonias tipo A

(Ito et al. 2008a, b; Majhi et al. 2009). Estas células madre se mantienen en un estado de reposo o quiescente, una estrategia que las protege del estrés al inhibir las señales que activan la diferenciación, ya sea intrínsecas o mediante interacciones entre células (Chen et al. 2017; Liao et al. 2014; Zhou et al. 2017). Por este motivo, la interpretación del mecanismo que permite a estas células persistir durante el estrés tendría implicaciones importantes para comprender la reducción de la fecundidad masculina, la calidad del esperma o incluso la infertilidad. En nuestro modelo experimental, el pez medaka, el estrés térmico demostró inducir la pérdida de la línea espermatogénica, de espermatocitos a espermatozoides. Esta pérdida de la línea germinal se debió principalmente a la inducción de la apoptosis, la cual se observó tempranamente mediante la regulación positiva de genes relacionados con la apoptosis, como *p53* y *bcl2*, lo que indica que tanto la vía apoptótica como la antiapoptótica están activas bajo estrés térmico. Sin embargo, lo más interesante en el tratamiento térmico fue que observamos células apoptóticas principalmente en la región medular del testículo, pero no en la porción distal del lóbulo donde se localizan las SSCs. Estos hallazgos en medaka coinciden con lo reportado recientemente en el pez cebra donde fue observado que la apoptosis se inicia primero en las células somáticas Trpv4 positivas (células de Leydig). En ese trabajo descubrieron que en las células de Leydig el gen Trpv4, que codifica el canal iónico sensible a la temperatura se regulaba al alza, específicamente a altas temperaturas. Además, la alta temperatura también redujo la síntesis de hormonas en las células de Leydig y provocó una pronta regulación a la baja de la motilidad de los espermatozoides (Yamamoto et al. 2024). Estos resultados sugieren que las SGa son menos susceptibles a la apoptosis que otras células germinales y somáticas, lo que sugiere además la existencia de un mecanismo protector de la diferenciación de SGa bajo estrés térmico. Además, en la región germinal del testículo, donde se encuentran las SSCs, observamos la activación de la vía Notch. La inhibición de esta vía bajo estrés térmico provocó un rápido deterioro de las células madre germinales espermatogénicas, sugiriendo que la activación de la vía Notch es esencial para el

mantenimiento de la línea germinal y podría asegurar la recuperación mediante el restablecimiento del ciclo espermatogénico.

Se ha observado que la vía Notch protege a diferentes tipos celulares de la apoptosis (Chadwick et al., 2010; Zetterberg et al., 2006). La apoptosis por una hipertermia también fue corroborada en un trabajo reciente donde se evaluó caspasa 3, observándose que, en principio, las células madres germinales no son positivas para la caspasa 3 clivada (Yamamoto et al., 2024), lo que convierte a la vía Notch en una interesante opción a analizar en la protección que presentan las espermatogonias ante un estrés térmico. En este sentido, la acción protectora de la apoptosis de Notch fue corroborada en embriones de pez cebra usando morfolinis contra *pen-2* y DAPT, como inhibidor de la actividad de este complejo γ -secretasa (Zetterberg et al., 2006), esencial para la correcta escisión y transducción de señales en el interior de la célula (Zhang et al., 2000). En el presente trabajo analizamos la expresión del miembro *Pen-2* de la vía Notch durante el estrés térmico, donde *pen-2* se expresó en niveles altos y, curiosamente, la proteína se limitó a la porción distal del lóbulo que rodea las SSCs, presuntamente en células presuntivas de Sertoli (Alix et al., 2020; Nishimura et al., 2016; Schulz et al., 2010). En este sentido, nuestras observaciones establecerían una comunicación entre células que protegen las SSCs de la apoptosis inducida por altas temperaturas, y la vía de Notch desempeñaría un papel importante en dicho mecanismo protector.

Además de la protección de las células germinales, la señalización Notch se ha relacionado con la regulación del estado de autorrenovación y/o la prevención de la diferenciación de las SSCs a través de la regulación de *Nanos2*, *Stra8*, *Bcl6b*, *Cxcr4* y otros genes en las espermatogonias tipo A indiferenciadas o SGa (Chen et al., 2005; Garcia et al., 2017, 2014; Oatley et al., 2006; Sada et al., 2012). Esta activación diferencial por temperatura en medaka promovería la protección a través de un estado de quiescencia y la inhibición concomitante de la diferenciación de SGa mediante la supresión de la espermatogénesis. La regulación negativa de Notch se produce

mediante la activación de la expresión de Jag1 (jagged 1) en células germinales que expresan Jag1 (García et al. 2014, 2017; Mäkelä y Hobbs 2019), un ligando que se expresa en altos niveles en nuestro estudio del tratamiento térmico en el pez medaka. En el caso del receptor NOTCH1, se expresa en células germinales indiferenciadas y en células de Sertoli de testículos de ratón, mientras que el ligando Dll4 se expresa de forma ubicua en células germinales y en algunas células de Sertoli (Murta et al. 2013). Durante la embriogénesis, la activación constitutiva de la señalización NOTCH1 en las células de Sertoli provocó la salida de los gonocitos del estado de quiescencia (García et al. 2013). En moscas, la señalización de Notch controla directamente el desarrollo y mantenimiento de las células madre de la línea germinal (Kimble y Crittenden 2007; McIntyre y Nance 2020), lo que refuerza la importancia de la señalización de Notch de célula a célula en la regulación de la diferenciación de las células germinales. En este sentido, nuestros resultados respaldan un fuerte vínculo entre la activación de la vía Notch y la inhibición de la espermatogénesis al aumentar la temperatura en peces.

Además, la inhibición de la proliferación de SGa se observó a nivel celular por la pérdida del linaje espermático, y también a nivel molecular por el aumento de genes relacionados con la inhibición de la proliferación de células germinales en peces, como *amh* (Morinaga et al. 2007). Además, se observa un aumento inicial en la proliferación de espermátocitos al aumentar la temperatura, lo que se corrobora con una disminución del inhibidor de la proliferación quística *ndrg1b* (Arias Padilla et al. 2021). Sin embargo, estos espermátocitos se detienen en la metafase I, como también lo corrobora una disminución de los marcadores de esperma, como *sycp3* (Iwai et al. 2006; Yuan et al. 2000). Algo remarcable es que si persiste la exposición a altas temperaturas se observa una drástica disminución en el número de espermátocitos y espermátidas, resultando un testículo con un número limitado de espermatogonias. Curiosamente, aunque nuestros resultados en medaka respaldan la activación de la vía Notch, incluidos los receptores, ligandos, γ -secretasa y los respectivos efectores de esta vía, la activación de las señales de Notch parece

funcionar en la dirección opuesta a la descrita anteriormente en otros trabajos, en la que la señal de entrada (alta temperatura) parece ser detectada por SGa, mientras que la salida parece estar en las células somáticas que presentaron una alta expresión de Pen-2, presumiblemente células de Sertoli (Nishimura e alt 2016). Esta activación diferencial por temperatura en medaka promovería la protección a través de un estado de inactividad y la inhibición concomitante de la diferenciación de SGa mediante la supresión de la espermatogénesis.

Otra observación interesante con relación a la apoptosis observada a altas temperaturas en las células de la gónada es una gran diferencia en el curso temporal de la respuesta apoptótica a la temperatura entre los experimentos *in vivo* y *ex vivo*. Estas diferencias en la respuesta podrían depender de que la exposición en un organismo completo presenta regulaciones diferentes o más complejas que las del cultivo de tejidos, tanto a nivel celular y paracrino, como a nivel sistémico y endocrino, lo que implica una limitación ya bien conocida en las experiencias de las exposiciones en experimentos *ex vivo*. Todo el organismo presenta diferentes estrategias para afrontar el aumento de temperatura a nivel sistémico, como la elevación del cortisol a través de una traducción cerebral por la hormona liberadora de corticotropina (Crh) en el hipotálamo, para la posterior síntesis de este glucocorticoide en la glándula suprarrenal/interrenal, y su acción moduladora en los órganos diana, como por ejemplo la gónada (Wang et al. 2011). En este sentido se ha observado en peces, como la anguila japonesa y el pejerrey, que un aumento de temperatura va acompañado de un aumento de cortisol, la principal hormona del estrés, a través de la activación de Crh en el cerebro (Fernandino et al. 2012; Mommsen et al . 1999; Ozaki et al. 2006). Este aumento de cortisol produce una elevación concomitante de los niveles de andrógenos, como efecto secundario, que promueve un aumento inicial de la espermatogénesis (Mommsen et al. 1999; Ozaki et al. 2006). Luego, bajo estrés térmico crónico, este efecto disminuye y se puede detectar un aumento de la apoptosis, como en nuestro estudio, así como en experimentos realizados en otras especies (Ito et al. 2008a). En cambio, el cultivo *ex vivo* no

presenta estas modulaciones homeostáticas ante factores externos, por lo que sus respuestas pueden acelerarse por el contacto directo con el estresor, en este caso la temperatura. Siempre teniendo en cuenta las limitaciones del enfoque *ex vivo*, la combinación de experimentos *in vivo* y *ex vivo* ha permitido dilucidar la regulación de la vía Notch en la protección de SGa frente al aumento de temperatura, mecanismo que cobra mayor relevancia en el escenario actual de calentamiento global/cambio climático.

CONCLUSIONES GENERALES

El hallazgo más significativo de esta tesis radica en la función crucial que desempeña la vía de señalización celular NOTCH en la supervivencia de las células madre germinales, particularmente en condiciones de estrés térmico. Se ha observado que, bajo estrés térmico, la vía NOTCH, a través de su receptor *notch1a* y sus ligandos *dll4* y *jag1-2*, desempeña un papel importante al mantener a las células madre germinales en un estado de quiescencia. En este estado de quiescencia, las células madre germinales se encuentran protegidas de la diferenciación y la apoptosis, permitiendo que ante la recuperación de las condiciones normales para esta especie la espermatogénesis pueda reactivarse y recuperarse.

Sin embargo, al bloquear esta señal mediante la inhibición de Pen2, la subunidad de la enzima gamma secretasa necesaria para la activación de la vía NOTCH, se interrumpe este mecanismo de protección. Como consecuencia, las células madre germinales pierden su estado quiescente protector y pueden comenzar a diferenciarse dentro de la línea germinal, lo que potencialmente las hace más susceptibles a la apoptosis.

Estos hallazgos sugieren un papel fundamental de la vía NOTCH en la regulación de la homeostasis de las células madre germinales bajo condiciones de estrés térmico. Además, destacan la importancia de comprender los mecanismos moleculares subyacentes a esta vía de señalización en el contexto de la espermatogénesis y la respuesta celular al estrés ambiental. En base a estos resultados hemos establecido un modelo abreviado en la **Figura 13**.

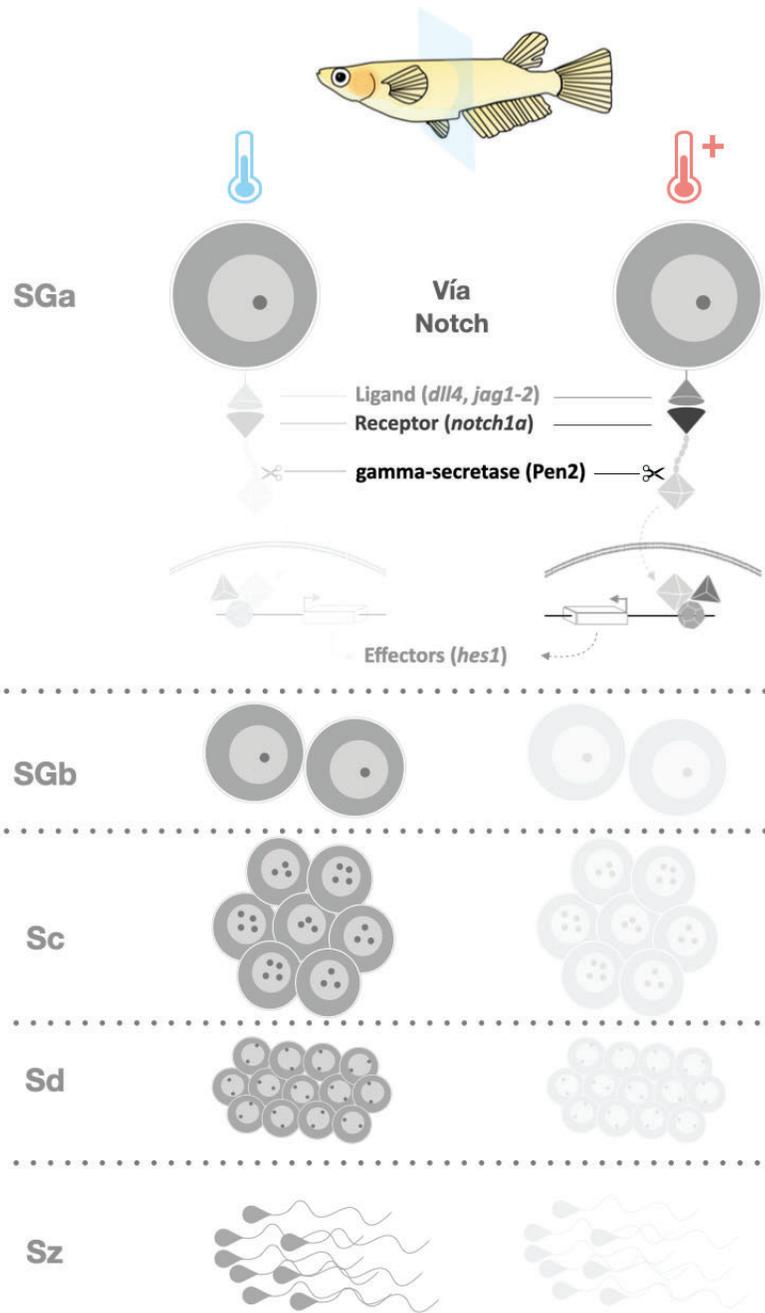


Figura 13. La activación de la vía Notch en células somáticas del testículo induce la inhibición de la espermatogénesis bajo exposición a temperaturas elevadas. SGa: espermatogonia de tipo A; SGb: espermatogonia de tipo b; Sc: espermatocito; Sd: espermatida; Sz: espermatozoide.

DIRECCIONES FUTURAS

- Ampliar el conocimiento y evaluar las diferentes posibilidades que pueden surgir en la interacción célula-célula y su resultado final permitirá profundizar en la comprensión de esta comunicación y la plasticidad de las señales, especialmente en la línea germinal y el estudio del nicho celular en sistemas complejos que involucran un gran número de señales y diferentes tipos celulares.
- Es fundamental determinar cómo las células pueden protegerse frente a adversidades en un momento en que el calentamiento global, el cáncer, los teratógenos y los tratamientos reproductivos son temas que cada vez adquieren más relevancia. La relación entre los receptores, los ligandos y el tipo de señalización (pulsátil o continua) es un campo atractivo que puede tener un impacto significativo en el tipo de señal y su modulación.
- Es importante recordar que la vía de señalización desempeña un papel crucial en el desarrollo temprano. Por lo tanto, es esencial investigar con mayor detalle cómo ocurre este proceso en el establecimiento de la línea germinal en estadios embrionarios.
- Los modelos como *Drosophila* y murinos sugieren que el tamaño y la organización de las células germinales madre están estrechamente relacionados con la expresión de Notch y su antagonista, un aspecto que aún no se ha explorado en peces. Considero que realizar un estudio de líneas germinales utilizando la técnica de CRISPR con sus diferentes variables (corte específico, tipo celular específico) brinda una oportunidad única para comprender con más detalle esta regulación y su impacto en la protección y el estado quiescente.

LISTA DE PUBLICACIONES

Moreno Acosta OD, Boan AF, Hattori RS, Fernandino JI. Notch pathway is required for protection against heat stress in spermatogonial stem cells in medaka. *Fish Physiol Biochem.* 2023 Jun;49(3):487-500. doi: 10.1007/s10695-023-01200-w. Epub 2023 May 1. PMID: 37126120.

Arias Padilla LF, Castañeda-Cortés DC, Rosa IF, **Moreno Acosta OD**, Hattori RS, Nóbrega RH, Fernandino JI. Cystic proliferation of germline stem cells is necessary to reproductive success and normal mating behavior in medaka. *Elife.* 2021 Mar 1;10:e62757. doi: 10.7554/eLife.62757. PMID: 33646121; PMCID: PMC7946426.

Butzge, A. J., Yoshinaga, T.T., **Moreno Acosta, O.D.**, Fernandino, J.I., Sanches, E.A., Tabata, Y.A., Oliveira, C., Hattori, R.S., 2021 Early Warming Stress on Juvenile Fish Impairs Testicular Development and Sperm Quality But Contrastingly Elicits Intergenerational Thermotolerance. Preprint. DOI: 10.21203/rs.3.rs-156005/v1.

BIBLIOGRAFÍA

- Ables, J. L., Breunig, J. J., Eisch, A. J., y Rakic, P. (2011). Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nature Reviews Neuroscience* 2011 12:5, 12(5), 269–283.
<https://doi.org/10.1038/nrn3024>
- Alix, M., Kjesbu, O. S., y Anderson, K. C. (2020). From gametogenesis to spawning: How climate-driven warming affects teleost reproductive biology. *Journal of Fish Biology*, 97(3), 607–632. <https://doi.org/10.1111/JFB.14439>
- Aguirre, A., Rubio, M. E., y Gallo, V. (2010). Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* 2010 467:7313, 467(7313), 323–327.
<https://doi.org/10.1038/nature09347>
- Alvarenga, É. R. de, y França, L. R. de. (2009). Effects of Different Temperatures on Testis Structure and Function, with Emphasis on Somatic Cells, in Sexually Mature Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*)1. *Biology of Reproduction*, 80(3), 537–544.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072827>
- Arias Padilla, L.F., Castañeda-Cortés, D.C., Rosa, I.F., Moreno Acosta, O.D., Hattori, R.S., Nóbrega, R.H., Fernandino, J.I., 2021. Cystic proliferation of germline stem cells is necessary to reproductive success and normal mating behavior in medaka. *Elife* 10, e62757.
<https://doi.org/10.7554/eLife.62757>
- Aulsebrook, L. C., Bertram, M. G., Martin, J. M., Aulsebrook, A. E., Brodin, T., Evans, J. P., Hall, M. D., O'Bryan, M. K., Pask, A. J., Tyler, C. R., y Wong, B. B. M. (2020). Reproduction in a polluted world: implications for wildlife. *Reproduction*, 160(2), R13-R23.
<https://doi.org/10.1530/REP-20-0154>
- Barber JR, Burdett CL, Reed SE, Warner KA, Formichella C, Crooks KR, Theobald DM y Fristrup

KM2011 Anthropogenic noise exposure in protected natural areas: estimating the scale of ecological consequences. *Landscape Ecology* 26 1281–1295.

(<https://doi.org/10.1007/s10980-011-9646-7>)

Bernhardt ES, Rosi EJ y Gessner MO 2017 Synthetic chemicals as agents of global change.

Frontiers in Ecology and the Environment 15 84–90. (<https://doi.org/10.1002/fee.1450>)

Blackshaw, A. W., y Massey, P. F. (1978). The effect of cryptorchidism on the quantitative histology, histochemistry and hydrolytic enzyme activity of the rat testis. *Australian Journal of Biological Sciences*, 31(1), 53–64.

Blanpain, C., Lowry, W. E., Pasolli, H. A., y Fuchs, E. (2006). Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes y Development*, 20(21), 3022–3035.

<https://doi.org/10.1101/GAD.1477606>

Bobe, J. (2015). Egg quality in fish: Present and future challenges. *Animal Frontiers*, 5(1), 66–72.

<https://doi.org/10.2527/af.2015-0010>

Bobe, J., y Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative*

Endocrinology, 165(3), 535–548. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2009.02.011>

Boeke, R. C., y Taylor, P. C. (2018). Seasonal energy exchange in sea ice retreat regions contributes to differences in projected Arctic warming. *Nature Communications*, 9(1).

<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07061-9>

Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M., y Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* (New York, N.Y.), 289(5479), 617–619. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.617>

<https://doi.org/10.1126/science.289.5479.617>

Braun R E , Behringer R R , Peschon J J , Brinster R L , Palmiter R D . Genetically haploid

spermatids are phenotypically diploid. *Nature*. 1989;337:373–376.

- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 678–689. <https://doi.org/10.1038/nrm2009>
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M., y Scadden, D. T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960), 841–846. <https://doi.org/10.1038/nature02040>
- Campbell, W. A., Yang, H., Zetterberg, H., Baulac, S., Sears, J. A., Liu, T., Wong, S. T. C., Zhong, T. P., y Xia, W. (2006). Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. *Journal of Neurochemistry*, 96(5), 1423–1440. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03648.x>
- Carlsen, E. (2003). History of febrile illness and variation in semen quality. *Human Reproduction*, 18(10), 2089–2092. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg412>
- Carlson, M. E., Suetta, C., Conboy, M. J., Aagaard, P., Mackey, A., Kjaer, M., y Conboy, I. (2009). Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Molecular Medicine*, 1(8–9), 381–391. <https://doi.org/10.1002/emmm.200900045>
- Castañeda Cortés, D.C., Arias Padilla, L.F., Langlois, V.S., Somoza, G.M., Fernandino, J.I., 2019. The central nervous system acts as a transducer of stress-induced masculinization through corticotropin-releasing hormone B. *Dev.* 146, 1–10. <https://doi.org/10.1242/dev.172866>
- Chadwick, N., Zeef, L., Portillo, V., Boros, J., Hoyle, S., van Doesburg, J. C. L., y Buckle, A. M. (2010). Notch protection against apoptosis in T-ALL cells mediated by GIMAP5. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 45(3), 201–209. <https://doi.org/10.1016/J.BCMD.2010.07.006>
- Chakrabarti, R., Celià-Terrassa, T., Kumar, S., Hang, X., Wei, Y., Choudhury, A., Hwang, J., Peng,

J., Nixon, B., Grady, J. J., DeCoste, C., Gao, J., van Es, J. H., Li, M. O., Aifantis, I., Clevers, H., y Kang, Y. (2018). Notch ligand Dll1 mediates cross-talk between mammary stem cells and the macrophageal niche. *Science*, 360(6396).

https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN4153/SUPPL_FILE/AAN4153_CHAKRABARTI_SM.PD

Chen, C., Ouyang, W., Grigura, V., Zhou, Q., Carnes, K., Lim, H., Zhao, G.-Q., Arber, S., Kurpios, N., Murphy, T.L., Cheng, A.M., Hassell, J.A., Chandrashekar, V., Hofmann, M.-C., Hess, R.A., Murphy, K.M., 2005. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* 436, 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/nature03894>

Chen, J., Cai, T., Zheng, C., Lin, X., Wang, G., Liao, S., Wang, X., Gan, H., Zhang, D., Hu, X., Wang, S., Li, Z., Feng, Y., Yang, F., Han, C., 2017. MicroRNA-202 maintains spermatogonial stem cells by inhibiting cell cycle regulators and RNA binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 45, 4142–4157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1287>

Chiarini-Garcia, H., Hornick, J. R., Griswold, M. D., y Russell, L. D. (2001). Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biology of Reproduction*, 65(4), 1179–1185.

Chung, E., y Brock, G. B. (2011). Cryptorchidism and its impact on male fertility: a state of art review of current literature. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada*, 5(3), 210–214. <https://doi.org/10.5489/cuaj.10106>

Chung JM, Lee SD. (2015). Individualized Treatment Guidelines for Postpubertal Cryptorchidism. *World J Mens Health.* 33(3):161-6. doi: 10.5534/wjmh.2015.33.3.161. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26770935; PMCID: PMC4709431.

Conboy, I. M., y Rando, T. A. (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Developmental Cell*, 3(3), 397–409. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00254-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00254-X)

- Dahlke, F. T., Wohlrab S., Butzin M., y Pörtner, H.-O. (2020). Thermal bottlenecks in the life cycle define climate vulnerability of fish. *Science*, 369(6499), 65–70.
- Delbès, G., Blázquez, M., Fernandino, J. I., Grigorova, P., Hales, B. F., Metcalfe, C., ... y Marlatt, V. (2022). Effects of endocrine disrupting chemicals on gonad development: Mechanistic insights from fish and mammals. *Environmental research*, 204, 112040.
- Denusta, P. J. T., De Jesus-Ayson, E. G., Laron, M. A., Aya, F. A., y Garcia, L. M. B. (2019). Gonad development and size-at-maturity of silver Therapon *Leiopotherapon plumbeus* (Kner 1864; Teleostei:Terapontidae) in tropical volcanic lakes in south Luzon, Philippines. *Journal of Applied Ichthyology*, 35, 933–943.
- Di Persio, S., Saracino, R., Fera, S., Muciaccia, B., Esposito, V., Boitani, C., Berloco, B. P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M., de Rooij, D. G., y Vicini, E. (2017). Spermatogonial kinetics in humans. *Development*, 144(19), 3430 LP – 3439. <https://doi.org/10.1242/dev.150284>
- Dixit R, Malaviya D, Pandiyan K, Singh U, Sahu A, Shukla R, Singh B, Rai J y Sharma P et al.2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability* 7 2189–2212. (<https://doi.org/10.3390/su7022189>)
- Donelson, J. M., Munday, P. L., McCormick, M. I., y Pitcher, C. R. (2012). Rapid transgenerational acclimation of a tropical reef fish to climate change. *Nature Climate Change*, 2, 30–32.
- Dulvy, N. K., Sadovy, Y., y Reynolds, J. D. (2003). Extinction vulnerability in marine populations. *Fish and Fisheries*, 4(1), 25–64. <https://doi.org/10.1046/J.1467-2979.2003.00105.X>
- dos Santos, N., Silva, M., y Vale, A. (2008). Fish and Apoptosis: Studies in Disease and Pharmaceutical Design. *Current Pharmaceutical Design*, 14(2), 170–183. <https://doi.org/10.2174/138161208783378734>
- Dym M , Fawcett D W . Further observations on the number of spermatogonia, spermatocytes, and

spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 1971;4:195–215.

Egami, N. (1971). Further notes on the life span of the teleost, *oryzias latipes*. *Exp. Gerontol.* 6: 379–382.

Elisio, M., Vitale, A., y Miranda, L. A. (2015). Influence of climate variations on Chascomús shallow lake thermal conditions and its consequences on the reproductive ecology of the Argentinian Silverside (*Odontesthes bonariensis*—Actinopterygii, Atherinopsidae). *Hydrobiologia*, 752, 155-166.

Fernandino, J. I., Popesku, J. T., Paul-Prasanth, B., Xiong, H., Hattori, R. S., Oura, M., Strüssmann, C. A., Somoza, G. M., Matsuda, M., Nagahama, Y., y Trudeau, V. L. (2011). Analysis of sexually dimorphic expression of genes at early gonadogenesis of pejerrey *Odontesthes bonariensis* using a heterologous microarray. *Sexual Development*, 5(2), 89–101.
<https://doi.org/10.1159/000324423>

Fischer, A., y Gessler, M. (2007). Delta–Notch—and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Research*, 35(14), 4583–4596. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm477>

Fortini, M. E. (2002). γ -Secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 673–684. <https://doi.org/10.1038/nrm910>

Fosheim, M., Primicerio, R., Johannesen, E., Ingvaldsen, R. B., Aschan, M. M., y Dolgov, A. V. (2015). Recent warming leads to a rapid borealization of fish communities in the Arctic. *Nature Climate Change* 2015 5:7, 5(7), 673–677. <https://doi.org/10.1038/nclimate2647>

Garcia, T. X., DeFalco, T., Capel, B., y Hofmann, M.-C. (2013). Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. *Developmental Biology*,

377(1), 188–201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.01.031>

Garcia, T. X., Farmaha, J. K., Kow, S., y Hofmann, M.-C. (2014). RBPJ in mouse Sertoli cells is required for proper regulation of the testis stem cell niche. *Development*, 141(23), 4468 LP – 4478. <https://doi.org/10.1242/dev.113969>

Garcia, T. X., y Hofmann, M. C. (2013). NOTCH signaling in Sertoli cells regulates gonocyte fate. 12(16), 2538–2545. <https://doi.org/10.4161/CC.25627>

González-Tokman, D., Córdoba-Aguilar, A., Dáttilo, W., Lira-Noriega, A., Sánchez-Guillén, R. A., y Villalobos, F. (2020). Insect responses to heat: physiological mechanisms, evolution and ecological implications in a warming world. *Biological Reviews*, 95(3), 802–821. <https://doi.org/10.1111/BRV.12588>

Grazer, V. M., y Martin, O. Y. (2012). Investigating climate change and reproduction: Experimental tools from evolutionary biology. *Biology*, 1, 411–438.

Grier, H. J. 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am. Zool.* 21, 345–357.

Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lo K, Lea DW y Medina-Elizade M (2006). Global temperature change. *PNAS* 103 14288–14293. (<https://doi.org/10.1073/pnas.0606291103>)

Hansen, P. J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1534), 3341–3350. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131>

Hardy, R. W., Tokuyasu, K. T., Lindsley, D. L., y Garavito, M. (1979). The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of ultrastructure research*, 69(2), 180–190. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(79\)90108-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(79)90108-4)

Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y., y Kitano, T.

(2010). High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Molecular Reproduction and Development*, 77(8), 679–686.

<https://doi.org/10.1002/MRD.21203>

Henrique, D., y Schweisguth, F. (2019). Mechanisms of Notch signaling: a simple logic deployed in time and space. *Development*, 146(3), dev172148. <https://doi.org/10.1242/dev.172148>

Hilgers, L., Schwarzer, J. (2019) The Natural History of Model Organisms: The untapped potential of medaka and its wild relatives. *eLife* 8:e46994.

Hillebrand, H., Blasius, B., Borer, E. T., Chase, J. M., Downing, J. A., Eriksson, B. K., Filstrup, C. T., Harpole, W. S., Hodapp, D., Larsen, S., Lewandowska, A. M., Seabloom, E. W., Van de Waal, D. B., y Ryabov, A. B. (2018). Biodiversity change is uncoupled from species richness trends: Consequences for conservation and monitoring. *Journal of Applied Ecology*, 55(1), 169–184. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12959>

Hinnant TD, Alvarez AA, Ables ET. (2017). Temporal remodeling of the cell cycle accompanies differentiation in the *Drosophila* germline. *Developmental Biology*. 2017 Sep;429(1):118-131. DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.07.001.

Hiroshi, O., Shinichi, A., y Yoshitake, N. (2003). Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biology of Reproduction*, 68(6), 2249–2254. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014779>

Hou Y, Wang X, Lei Z, et al. (2015). Heat-stress-induced metabolic changes and altered male reproductive function. *J Proteome Res*, 14(3):1495–503.

Hutson, J., Li, R., Southwell, B., Petersen, B., y Thorup, J. (2013). Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism? In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 3, p. 176).

- Ito, L. S., Takahashi, C., Yamashita, M., y Strüssmann, C. A. (2008). Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration, and germ cell loss in subadult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes). *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(6), 762–774. <https://doi.org/10.1086/590219>
- Iwai, T., Yoshii, A., Yokota, T., Sakai, C., Hori, H., Kanamori, A., Yamashita, M., 2006. Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*. *Exp. Cell Res.* 312, 2528–2537. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.04.015>
- Iwasaki, Y., Ohkawa, K., Sadakata, H., Kashiwadate, A., Takayama-Watanabe, E., Onitake, K., y Watanabe, A. (2009). Two states of active spermatogenesis switch between reproductive and non-reproductive seasons in the testes of the medaka, *Oryzias latipes*. *Development, growth y differentiation*, 51(6), 521-532.
- Kadekar, P., y Roy, R. (2019). AMPK regulates germline stem cell quiescence and integrity through an endogenous small RNA pathway. *PLOS Biology*, 17(6), e3000309.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., y Kobayashi, T. (2007). The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development*, 134(7), 1243–1251.
- Karnatak, G., Sarkar, U. K., Naskar, M., Roy, K., Gupta, S., Nandy, S. K., ... Verma, V. K. (2018). Understanding the role of climatic and environmental variables in gonadal maturation and spawning periodicity of spotted snakehead, *Channa punctata* (Bloch, 1793) in a tropical floodplain wetland, India. *Environmental Biology of Fishes*, 101, 595–607.
- Kawaguchi, D., Furutachi, S., Kawai, H., Hozumi, K., y Gotoh, Y. (2013). Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nature Communications 2013 4:1*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2895>
- Kiger, A. A., Jones, D. L., Schulz, C., Rogers, M. B., y Fuller, M. T. (2001). Stem cell self-renewal

specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* (New York, N.Y.), 294(5551), 2542–2545. <https://doi.org/10.1126/science.1066707>

Kimble, J., y Crittenden, S. L. (2007). Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. *Annual review of cell and developmental biology*, 23, 405–433. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.1233>

Kimble J. (2011). Molecular regulation of the mitosis/meiosis decision in multicellular organisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(8):a002683. doi: 10.1101/cshperspect.a002683.

Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K., y Tanaka, M. (2012). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols. In *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780813818849>

Kitadate, Y., y Kobayashi, S. (2010). Notch and Egfr signaling act antagonistically to regulate germ-line stem cell niche formation in *Drosophila* male embryonic gonads. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14241–14246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003462107>

Kjesbu, O. S., Righton, D., Krüger-Johnsen, M., Thorsen, A., Michalsen, K., Fonn, M., y Witthames, P. R. (2010). Thermal dynamics of ovarian maturation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67, 605–625.

Kjesbu, O. S., Bogstad, B., Devine, J. A., Gjøsæter, H., Howell, D., Ingvaldsen, R. B., ... Skjæraasen, J. E. (2014). Synergies between climate and management for Atlantic cod fisheries at high latitudes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 3478–3483.

La, H. M., y Hobbs, R. M. (2019). Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue

20, pp. 4071–4102). Springer International Publishing.

<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03201-6>

Lei, L., y Spradling, A. C. (2013). Mouse primordial germ cells produce cysts that partially fragment prior to meiosis. *Development (Cambridge, England)*, 140(10), 2075–2081.

<https://doi.org/10.1242/dev.093864>

Liao, H.-F., Chen, W. S. C., Chen, Y.-H., Kao, T.-H., Tseng, Y.-T., Lee, C.-Y., Chiu, Y.-C., Lee, P.-L., Lin, Q.-J., Ching, Y.-H., Hata, K., Cheng, W. T. K., Tsai, M.-H., Sasaki, H., Ho, H.-N., Wu, S.-C., Huang, Y.-H., Yen, P., y Lin, S.-P. (2014). DNMT3L promotes quiescence in postnatal spermatogonial progenitor cells. *Development*, 141(12), 2402 LP – 2413.

<https://doi.org/10.1242/dev.105130>

Liu, Y., Tang, H., Xie, R., Li, S., Liu, X., Lin, H., ... Cheng, C. H. K. (2017). Genetic evidence for multifactorial control of the reproductive axis in zebrafish. *Endocrinology*, 158, 604–611.

Longcore T y Rich C 2004 Ecological light pollution. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2 191–198. ([https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0191:ELP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0191:ELP]2.0.CO;2))

Lue, Y.-H., Sinha Hikim, A. P., Swerdloff, R. S., Im, P., Taing, K. S., Bui, T., Leung, A., y Wang, C. (1999). Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, 140(4), 1709–1717.

Maillard, I. (2014). Notch and human hematopoietic stem cells. *Blood* 123, 1115–1116.

doi:10.1182/blood-2014-01-546754

Majhi, S. K., Hattori, R. S., Yokota, M., Watanabe, S., y Strüssmann, C. A. (2009). Germ Cell Transplantation Using Sexually Competent Fish: An Approach for Rapid Propagation of Endangered and Valuable Germlines. *PLOS ONE*, 4(7), e6132.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006132>

- Mäkelä, J.-A., y Hobbs, R. M. (2019). Molecular regulation of spermatogonial stem cell renewal and differentiation. *Reproduction*, 158(5), R169–R187. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0476>
- Marlatt, V. L., Bayen, S., Castaneda-Cortès, D., Delbès, G., Grigorova, P., Langlois, V. S., ... y Van Der Kraak, G. (2022). Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife and humans. *Environmental Research*, 208, 112584.
- Mathur, D., Bost, A., Driver, L., y Ohlstein, B. (2010). A transient niche regulates the specification of drosophila intestinal stem cells. *Science*, 327(5962), 210–213. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1181958/SUPPL_FILE/MATHUR.SOM.PDF
- Matova, N., y Cooley, L. (2001). Comparative aspects of animal oogenesis. *Developmental biology*, 231(2), 291–320. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0120>
- McIntyre, D. C., y Nance, J. (2020). Niche Cell Wrapping Ensures Primordial Germ Cell Quiescence and Protection from Intercellular Cannibalism. *Current Biology*, 30(4), 708-714.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.021>
- Mieusset, R., y Bujan, L. (1995). Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *International Journal of Andrology*, 18(4), 169–184.
- Migaud, H., Davie, A., y Taylor, J. F. (2010). Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *Journal of Fish Biology*, 76, 27–68.
- Miranda, L. A., Chalde, T., Elisio, M., y Strüssmann, C. A. (2013). Effects of global warming on fish reproductive endocrine axis, with special emphasis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 45–54.
- Mishra, S. R. (2021). Behavioural, physiological, neuro-endocrine and molecular responses of cattle against heat stress: an updated review. *Tropical Animal Health and Production 2021*

53:3, 53(3), 1–40. <https://doi.org/10.1007/S11250-021-02790-4>

Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., y Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211–268.

<https://doi.org/10.1023/A:1008924418720/METRICS>

Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M., y Kondoh, H. (2007). The *hotei* mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9691–9696.

Munakata, A., y Kobayashi, M. (2010). Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 456–468.

<https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2009.04.011>

https://doi.org/10.1073/PNAS.0611379104/SUPPL_FILE/11379FIG7.PDF

Murata, K., Kinoshita, M., Naruse, K., Tanaka, M., y Kamei, Y. (Eds.). (2019). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Volume 2*. John Wiley y Sons.

Nakamura, S., Watakabe, I., Nishimura, T., Toyoda, A., Taniguchi, Y., y Tanaka, M. (2012). Analysis of medaka *sox9* orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance. *PLoS ONE*,

7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029982>

Nishimura, T., Nakamura, S., y Tanaka, M. (2016). A structurally and functionally common unit in testes and ovaries of medaka (*Oryzias latipes*), a teleost fish. *Sexual Development*, 10(3), 159–165.

Nóbrega, R. H., Greebe, C. D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L. R., y Schulz, R. W. (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in

zebrafish. *PLoS ONE*, 5(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012808>

Nowell, C. S., y Radtke, F. (2017). Notch as a tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer*, 17(3), 145–159. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.145>

Oatley, J. M., Avarbock, M. R., Telaranta, A. I., Fearon, D. T., y Brinster, R. L. (2006). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25), 9524 LP – 9529.

O'Brien, K. A., Murray, A. J., y Simonson, T. S. (2022). Notch Signaling and Cross-Talk in Hypoxia: A Candidate Pathway for High-Altitude Adaptation. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(3), 437. <https://doi.org/10.3390/life12030437>

Okegbe, T. C., y di Nardo, S. (2011). The endoderm specifies the mesodermal niche for the germline in *Drosophila* via Delta-Notch signaling. *Development*, 138(7), 1259–1267. <https://doi.org/10.1242/DEV.056994>

Orr HA (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews: Genetics* 10 531–539. (<https://doi.org/10.1038/nrg2603>)

Ozaki, Y., Higuchi, M., Miura, C., Yamaguchi, S., Tozawa, Y., y Miura, T. (2006). Roles of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Fish Spermatogenesis. *Endocrinology*, 147(11), 5139–5146. <https://doi.org/10.1210/EN.2006-0391>

Pankhurst, N. W., y King, H. R. (2010). Temperature and salmonid reproduction: Implications for aquaculture. *Journal of Fish Biology*, 76, 69–85.

Pankhurst, N. W., y Munday, P. L. (2011). Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Marine and Freshwater Research*, 62, 1015.

Pörtner, H. O., y Farrell, A. P. (2008). Physiology and climate change. *Science*, 322, 690–692.

- Pörtner, H. O., y Peck, M. A. (2010). Climate change effects on fishes and fisheries: Towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Fish Biology*, 77, 1745–1779.
- Pörtner, H.-O., Roberts, D. C., Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Tignor, M., Poloczanska, E., y Weyer, N. (2019). Summary for Policymakers. IPCC special report on the ocean and cryosphere in a changing climate. IPCC.
- Pudney, J. 1993. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In *The Sertoli Cell*, (Eds L. D. Russell y M. D. Griswold), pp. 611–657. Cache River Press, Clearwater, FL.
- Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., y Tena-Sempere, M. (2008). New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 48–69.
- Robin, G., Boitrelle, F., Marcelli, F., Colin, P., Leroy-Martin, B., Mitchell, V., Dewailly, D., y Rigot, J. M. (2010). Cryptorchidie: de la physiopathologie à l'infertilité [Cryptorchidism: from physiopathology to infertility]. *Gynecologie, obstetrique y fertilité*, 38(10), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2010.08.015>
- Rockett, J. C., Mapp, F. L., Garges, J. B., Luft, J. C., Mori, C., y Dix, D. J. (2001). Effects of Hyperthermia on Spermatogenesis, Apoptosis, Gene Expression, and Fertility in Adult Male Mice. *Biology of Reproduction*, 65(1), 229–239. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.229>
- Rodríguez-Marí, A., Cañestro, C., BreMiller, R. A., Nguyen-Johnson, A., Asakawa, K., Kawakami, K., y Postlethwait, J. H. (2010). Sex Reversal in Zebrafish fancl Mutants Is Caused by Tp53-Mediated Germ Cell Apoptosis. *PLOS Genetics*, 6(7), e1001034. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1001034>
- Sada, A., Hasegawa, K., Pin, P. H., y Saga, Y. (2012). NANOS2 Acts Downstream of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Signaling to Suppress Differentiation of Spermatogonial

Stem Cells. *STEM CELLS*, 30(2), 280–291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/stem.790>

Sakae, Y., Oikawa, A., Sugiura, Y., Mita, M., Nakamura, S., Nishimura, T., Suematsu, M., y Tanaka, M. (2020). Starvation causes female-to-male sex reversal through lipid metabolism in the teleost fish, medaka (*Olyzias latipes*). *Biology Open*, 9(4).

<https://doi.org/10.1242/BIO.050054/222746>

Sakae, Y., y Tanaka, M. (2021). Metabolism and Sex Differentiation in Animals from a Starvation Perspective. *Sexual Development*, 15(1–3), 168–178. <https://doi.org/10.1159/000515281>

Sarida, M., Hattori, R. S., Zhang, Y., Yamamoto, Y., y Strüssmann, C. A. (2019). Spatiotemporal Correlations between *amh* and *cyp19a1a* Transcript Expression and Apoptosis during Gonadal Sex Differentiation of Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sexual Development : Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 13(2), 99–108. <https://doi.org/10.1159/000498997>

Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., y Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390–411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>

Selim, K. M., Shinomiya, A., Otake, H., Hamaguchi, S., y Sakaizumi, M. (2009). Effects of high temperature on sex differentiation and germ cell population in medaka, *Oryzias latipes*. *Aquaculture*, 289(3–4), 340–349. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2008.12.019>

Selkoe, D., y Kopan, R. (2003). NOTCH AND PRESENILIN: Regulated Intramembrane Proteolysis Links Development and Degeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 26(1), 565–597. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131334>

Servili, A., Canario, A. V. M., Mouchel, O., y Antonio Muñoz-Cueto, J. (2020). Climate change

impacts on fish reproduction are mediated at multiple levels of the brain-pituitary-gonad axis. *General and Comparative Endocrinology*, 291, 113439.

Setchell, B. P. (1998). The Parkes Lecture Heat and the testis. *Reproduction*, 114(2), 179–194.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1140179>

Shima, A., y Mitani, H. (2004). Medaka as a research organism: past, present and future. *Mechanisms of Development*, 121(7–8), 599–604. <https://doi.org/10.1016/J.MOD.2004.03.011>

Shima, J. S., Osenberg, C. W., Alonzo, S. H., Noonburg, E. G., Mitterwallner, P., y Swearer, S. E. (2020). Reproductive phenology across the lunar cycle: Parental decisions, offspring responses, and consequences for reef fish. *Ecology*, 00(00), e03086.

Shimizu, S., Shinohara, Y., y Tsujimoto, Y. (2000). Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000 19:38, 19(38), 4309–4318. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203788>

Song, X., Call, G. B., Kirilly, D., y Xie, T. (2007). Notch signaling controls germline stem cell niche formation in the *Drosophila* ovary. *Development*, 134(6), 1071–1080.
<https://doi.org/10.1242/DEV.003392>

Sumita, R., Nishimura, T., y Tanaka, M. (2021). Dynamics of spermatogenesis and change in testicular morphology under ‘mating’ and ‘non-mating’ conditions in medaka (*Oryzias latipes*). *Zoological science*, 38(5), 436-443.

Sundby, S., Drinkwater, K. F., y Kjesbu, O. S. (2016). The North Atlantic spring-bloom system - where the changing climate meets the winter dark. *Frontiers in Marine Science*, 3, 28.

Tanaka M. Germline stem cells are critical for sexual fate decision of germ cells. *Bioessays*. 2016 Dec;38(12):1227-1233. doi: 10.1002/bies.201600045. Epub 2016 Oct 4. PMID: 27699806;

PMCID: PMC5132020.

Tanentzapf G, Devenport D, Godt D, Brown NH. Integrin-dependent anchoring of a stem-cell niche.

Nat Cell Biol. 2007 Dec;9(12):1413-8. doi: 10.1038/ncb1660. Epub 2007 Nov 4. PMID:

17982446; PMCID: PMC3529653.

Takemura, A., Rahman, M. S., Nakamura, S., Park, Y. J., y Takano, K. (2004). Lunar cycles and reproductive activity in reef fishes with particular attention to rabbitfishes. *Fish and Fisheries*, 5, 317–328.

Tobari, Y., y Tsutsui, K. (2019). Effects of social information on the release and expression of gonadotropin-inhibitory hormone in birds. *Frontiers in Endocrinology*, 10(APR), 1–6.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00243>

Tulina, N., y Matunis, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5551), 2546–2549.

<https://doi.org/10.1126/science.1066700>

Tveiten, H., Solevåg, S. E., y Johnsen, H. K. (2001). Holding temperature during the breeding season influences final maturation and egg quality in common wolffish. *Journal of Fish Biology*, 58(2), 374–385. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.2001.TB02259.X>

Urry, R. L., Carrell, D. T., Starr, N. T., Snow, B. W., y Middleton, R. G. (1994). The incidence of antisperm antibodies in infertility patients with a history of cryptorchidism. *The Journal of urology*, 151(2), 381–383. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)34954-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)34954-6)

Vagner, M., Zambonino-Infante, J.-L., y Mazurais, D. (2019). Fish facing global change: Are early stages the lifeline? *Marine Environmental Research*, 147, 159–178.

Van Der Kraak, G., y Pankhurst, N. W. (1997). Temperature effects on the reproductive performance of fish. In C. M. Wood y D. G. McDonald (Eds.), *Global warming* (pp.

159–176). Cambridge: Cambridge University Press.

Villegas-Hernández, H., Lloret, J., y Muñoz, M.(2015). Reproduction, condition and abundance of the Mediterranean bluefish (*Pomatomus saltatrix*) in the context of sea warming. *Fisheries Oceanography*, 24, 42–56.

Wabik, A., y Jones, P. H. (2015). Switching roles: the functional plasticity of adult tissue stem cells. *The EMBO Journal*, 34(9), 1164–1179.

<https://doi.org/https://doi.org/10.15252/emj.201490386>

Walsh, B. S., Parratt, S. R., Hoffmann, A. A., Atkinson, D., Snook, R. R., Bretman, A., y Price, T. A. R. (2019). The Impact of Climate Change on Fertility. *Trends in Ecology and Evolution*, 34(3), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.12.002>

Wang, N., Teletchea, F., Kestemont, P., Milla, S., y Fontaine, P. (2010). Photothermal control of the reproductive cycle in temperate fishes: Photothermal control of reproduction. *Reviews in Aquaculture*, 2, 209–222.

Ward, E. J., Shcherbata, H. R., Reynolds, S. H., Fischer, K. A., Hatfield, S. D., y Ruohola-Baker, H. (2006). Stem Cells Signal to the Niche through the Notch Pathway in the *Drosophila* Ovary. *Current Biology*, 16(23), 2352–2358. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.022>

Xia, W. (2019). γ -Secretase and its modulators: Twenty years and beyond. *Neuroscience Letters*, 701, 162–169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.02.011>

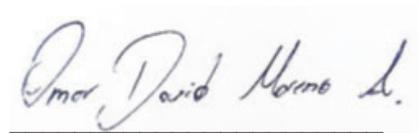
Yamamoto, Y., Hishikawa, D. y Ono, F. (2024). Trpv4-mediated apoptosis of Leydig cells induced by high temperature regulates sperm development and motility in zebrafish. *Commun Biol* 7, 96. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05740-y>

Yow DM 2007 Urban heat islands: observations, impacts, and adaptation. *Geography Compass* 1 1227–1251. (<https://doi.org/10.1111/j.1749-8198.2007.00063.x>)

- Yuan, L., Liu, J.-G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., Höög, C., 2000. The Murine SCP3 Gene Is Required for Synaptonemal Complex Assembly, Chromosome Synapsis, and Male Fertility. *Mol. Cell* 5, 73–83. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80404-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80404-9)
- Zetterberg, H., Campbell, W. A., Hong, W. Y., y Xia, W. (2006). The cytosolic loop of the γ -secretase component presenilin enhancer 2 protects zebrafish embryos from apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11933–11939.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., y Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960), 836–841. <https://doi.org/10.1038/nature02041>
- Zhang, Z., Hu, J. (2007). Development and Validation of Endogenous Reference Genes for Expression Profiling of Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to Endocrine Disrupting Chemicals by Quantitative Real-Time RT-PCR. *Toxicol. Sci.* 95, 356–368. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl161>
- Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., y Yankner, B. A. (2000). Presenilins are required for γ -secretase cleavage of β -APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nature Cell Biology*, 2(7), 463–465. <https://doi.org/10.1038/35017108>
- Zhang, X., Guan, G., Li, M., Zhu, F., Liu, Q., Naruse, K., Herpin, A., Nagahama, Y., Li, J., y Hong, Y. (2016). Autosomal *gsdf* acts as a male sex initiator in the fish medaka. *Scientific reports*, 6, 19738. <https://doi.org/10.1038/srep19738>
- Zhou, Z., Kawabe, H., Suzuki, A., Shinmyozu, K., y Saga, Y. (2017). NEDD4 controls spermatogonial stem cell homeostasis and stress response by regulating messenger ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*, 8, 15662. <https://doi.org/10.1038/ncomms15662>

Zucchetta, M., Cipolato, G., Pranovi, F., Antonetti, P., Torricelli, P., Franzoi, P., y Malavasi, S. (2012). The relationships between temperature changes and reproductive investment in a Mediterranean goby: Insights for the assessment of climate change effects. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 101, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.01.009>

El presente documento es la versión final de la tesis, la cual incluye los cambio/correcciones sugeridos por los jurados.



Omar David Moreno Acosta



Dr. Juan Ignacio Fernandino