

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE GENS REGULADORS
DE L'APOPTOSI DURANT L'ESPERMATOGÈNESI
DE LA RATA ADULTA.**

Òscar Martínez Tirado
URB, Hospital Materno-Infantil
Hospitals Vall d'Hebrón

TESI DOCTORAL

UNIVERSITAT AUTONÒMA DE BARCELONA

Programa de Doctorat: Bioquímica i Biologia Molecular. Bienni: 1996-1998

**ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE GENS REGULADORS DE
L'APOPTOSI DURANT L'ESPERMATOGÈNESI DE LA
RATA ADULTA.**

Memòria presentada per Òscar Martínez Tirado per optar al grau de Doctor en
Bioquímica i Biologia Molecular

Tesi Doctoral realitzada a la Unitat de Recerca Biomèdica de l'Hospital Materno-
Infantil de la Vall d'Hebron, sota la direcció de la Dra. Francina Munell Casadesus i el
Dr. Jaume Reventós Puigjaner

Tesi adscrita al departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències,
Universitat Autònoma de Barcelona

Tutor: Dra Margarita Sentís

L'interessat:

Els Co-Directors de la Tesi

Òscar Martínez

Dra. Francina Munell

Dr. Jaume Reventós

Oh Siva, quina és la teva realitat?
Què és aquest univers ple d'estupor?
Què forma la llavor?
Qui fa de botó de la roda de l'univers?
Què és aquesta vida més enllà de la forma
que inpregna les formes?
Com podem entra-hi de ple,
per sobre de l'espai i del temps,
dels noms i de les connotacions?
Aclareix els meus dubtes!

D'un text sagrat del sivaisme caixmir.

Als meus pares
A la meva germana
A Silvia

AGRAÏMENTS

A Francina Munell, co-directora d'aquesta tesi, la qual m'ha transmet les seves inquietuds durant tot aquest temps, m'ha recolzat en els moments difícils i m'ha ensenyat lo dur que és ser honrat en el món científic.

A Jaume Reventós, co-director d'aquesta tesi, per haver-m'hi acollit en el seu laboratori i haver-me permès iniciar aquest camí en el món de la ciència.

A la Dra. Toràn, per la seva amable i eficaç col·laboració, d'indubtable valor pel desenvolupament d'aquesta tesi.

Al Dr. Durand, per haver-me acollit en el seu laboratori i haver-me ajudat amb els meus problemes d'adaptació durant la meva estada a França.

Al Dr. Suárez-Quian, per haver-me acollit en el seu laboratori, haver confiat en mi per l'establiment de la seva independència en el món de la biologia molecular i per haver-se mostrat com un veritable amic.

Als membres del laboratori 2 i del laboratori 16, però en especial als meus amics, Cristina Aresté, Núria Bofill, Cristina Cebrián, Joan Isern, Nouredin Loukili, Lluís Palenzuela i Olga Tornavaca, dels quals n'he gaudit intel·lectual i emocionalment. Que la fi d'aquesta etapa no sigui la fi de la nostra amistat.

Al meu company i amic, David Martínez Selva, amb el qual he afrontat penes i alegries durant aquests 5 anys, malgrat els nostres tira i arronsa, li agraeixo moltíssim que hagi estat allà quan era necessari.

Als meus pares, que m'han recolzat incondicionalment en totes les decisions que he pres, deixant-me escollir en tot moment el que jo desitjava no sense dir la seva.

A Silvia, per haver estat al meu costat sempre que la he necessitat, per la seva intel·ligència, maduresa i visió crítica de la vida, la seva companyia i el seu amor.

INDEX

1.INTRODUCCIÓ	17
1.1 Organització testicular	19
1.2 Procés espermatogènic	20
a) Espermatòcitogènesi o proliferació mitòtica	21
b) Fase meiòtica	21
c) Espermiogènesi	22
1.3 Estadis del cicle espermatogènic	22
1.4 Regulació hormonal de l'espermatogènesi	23
1.5 Mort cel.lular programada	25
1.5.1 Regulació gènica de la mort cel.lular programada	27
a) Caspases	27
b) Família de Bcl-2	30
1.5.2 Mitocòndries i apoptosi	31
1.5.3 Mitocòndries i caspases	33
1.5.4 Apoptosi mitjançada per receptors de membrana	34
1.6 Mort cel.lular programada durant l'espermatogènesi	35
1.6.1 Regulació hormonal i gènica de la funció gonadal i de la MCP en el testicle normal	37
2. OBJECTIUS	41
3. MATERIAL I MÈTODES	45
3.1 Animals i tractament	47
3.2 Síntesi d'EDS (Jackson i Jackson, 1994)	48
3.3 Aïllament de les cèl.lules germinals	49
3.4 Assaig de TUNEL	50
3.5 Anàlisi de la Fragmentació del DNA/Southern blot Analysis	50
3.6 Extracció de RNA total	51
3.7 Extracció de mRNA	52
3.8 RT-PCR de Bax, Bcl-2, Bcl-x, Caspasa-3, ER beta i Rat HRP-1	53

3.9 Immunohistoquímica per a Bax, Bcl-2, Receptor d'Andrògens (AR) i Mouse HRP-1	54
3.10 Immunohistoquímica per ER	55
3.11 Extracció proteica i Western blot per a Bax, Bcl-2, Bcl _{xL/S} , Er , Caspasa-3, AR i Proteïna Transportadora d'Andrògens (ABP)	55
3.12 Separació de nuclis i citosols	56
3.13 Laser Capture Microdissection (LCM)	57
3.14 Línies cel.lulars	57
3.15 Tripsinització	58
3.16 Congelació i descongelació de cèl.lules	58
3.17 RNA Differential Display	59
3.17.1 Síntesi de la primera cadena de DNA mitjançant transcripció reversa	59
3.17.2 Amplificació del cDNA mitjançant PCR	60
3.17.3 Electroforesi en gel desnaturitzant de poliacril.lamida	60
3.17.4 Retall, el.lució i reamplificació de les bandes diferencials	62
3.18 Subclonatge de les bandes diferencials obtingudes	62
3.18.1 Lligació del cDNA	62
3.18.2 Transformació de bacteris i subclonatge	64
3.18.3 Purificació, reamplificació i identificació de les bandes subclonades	64
3.19 Seqüenciació de Plasmids i productes de PCR	65
3.20 Northern Blot	66
3.21 Screening d'una llibreria de cDNA de testicle de rata	67
3.21.1 Sembrat i titulació de la llibreria	67
3.21.2 Screening	68
3.22 Hibridació "in situ" de mRNAs en seccions parafinades utilitzant sondes marcades amb digoxigenina	69
4. RESULTATS	73
4.1 Avaluació morfològica	74
4.2 Avaluació "in situ" de l'apoptosi a cèl.lules germinals	77
4.3 Avaluació de la fragmentació del DNA	78

4.4 Expressió del mRNA dels gens de la Família de Bcl-2 i Caspasa-3 després dels tractaments amb MAA	80
4.5 Expressió del mRNA de Bax, Bcl-2 i Caspasa-3 després dels tractaments amb EDS	81
4.6 Immunodetecció de Bax i Bcl-2 en espermatòcits en fase de paquitè després de d'administració de MAA	82
4.7 Immunodetecció de Bax i Bcl-2 en animals tractats amb EDS	84
4.8 Canvis d'expressió de les proteïnes Bax, Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs i Caspasa-3 després del tractament amb MAA	85
4.9 Canvis d'expressió de les proteïnes Bax, Bcl-2 i Caspasa-3 després del tractament amb EDS	87
4.10 Expressió del mRNA del receptor d'andrògens (AR) en els animals tractats amb MAA i EDS	88
4.11 Immunodetecció d'AR en els animals tractats amb MAA i EDS	88
4.12 Captura de túbuls seminífers de forma específica segons el seu estadi de cicle espermatogènic amb la tècnica de LCM	90
4.13 Integritat del RNA extret a partir de túbuls capturats amb el Làser	91
4.14 Expressió dels mRNAs d'AR i ABP en funció de l'estadi espermatogènic per RT-PCR a partir de túbuls seminífers capturats amb la tècnica de LCM	91
4.15 Expressió dels mRNAs d'AR i ABP en línies cel.lulars de Sertoli després de l'administració de MAA	92
4.16 Estudi de l'expressió proteica d'AR i ABP en línies cel.lulars de Sertoli després de l'administració de MAA	93
4.17 Expressió del mRNA del receptor d'estrògens beta (ER β) després de l'administració de MAA	93
4.18 Immunodetecció del ER β en espermatòcits primaris en fase de paquitè després de l'administració de MAA	94
4.19 Expressió dels mRNAs d'ER β en funció de l'estadi espermatogènic per RT-PCR a partir de túbuls seminífers capturats amb la tècnica de LCM 12 hores després del tractament amb MAA	97
4.20 Sobreexpressió de la proteïna de l'ER β després de l'administració de MAA	98

4.21 Activació de l'ER transfectat a cèl.lules HepG2 mitjançada per la interacció de MAA	99
4.22 Expressió gènica diferencial detectada per Differential Display en les cèl.lules germinals aïllades dels testicles de les rates tractades amb EDS i MAA	100
4.23 Reamplificació de les bandes retallades amb la tècnica del DD	101
4.24 Identificació de les bandes reamplificades	102
4.25 Confirmació de la diferencialitat des dos cDNAs diferencialment expressats per Northern Blot	103
4.26 Screening de la llibreria de cDNA de testicle de rata	105
4.27 Caracterització del clon A9	106
4.28 Obtenció del ORF del con C9	110
4.29 Caracterització del con C9	111
4.30 Estudi de l'expressió del RNA de Rdes i HARP en diferents teixits per Northern blot	113
4.31 Localització dels canvis en l'expressió gènica de Rdes en les seccions de testicles de rates tractades amb MAA i EDS	114
4.32 Localització dels canvis en l'expressió gènica d'HARP en les seccions de testicles de rates tractades amb MAA i EDS	117
4.33 Expressió diferencial de la proteïna de ratolí HRP-1 entre rates controls i rates sacrificades 12 hores després del tractament amb MAA	119
5. DISCUSSIÓ	121
5.1 Apoptosi durant l'espermatogènesi normal	123
5.2 Apoptosi induïda per l'administració d'EDS i MAA	123
5.3 Paper dels gens de la família Bcl-2 durant l'apoptosi induïda per tòxics en el testicle de la rata adulta	125
5.4 Paper de la Caspasa-3 com a executora de l'apoptosi induïda per l'administració d'EDS i MAA	128
5.5 Receptors esteroidals durant l'espermatogènesi	129
5.6 Paper dels receptors esteroidals en l'apoptosi induïda al testicle de la rata adulta	130
5.7 Nous gens involucrats en el procés apoptòtic	134

5.8 Desaturases i el seu possible paper en apoptosi	136
5.9 Possible paper d'un nou membre de la família de factors de creixement HDGF en el procés apoptòtic	138
6. CONCLUSIONS	140
7. BIBLIOGRAFÍA	144

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Organització testicular

El testicle és l'òrgan reproductor masculí i està format per un gran nombre de túbuls seminífers espiralitzats. Té dos funcions principals: la producció d'hormones, responsables del manteniment de les funcions reproductives en la vida adulta (Cupps, 1991) i la producció d'espermatozoides, encarregats de la transmissió dels gens paternals a l'embrió i responsables de la conservació de l'espècie (Erickson, 1993).

Els andrògens són les hormones més importants produïdes, malgrat que també es produeixen estrògens, inhibina i activina d'entre d'altres (Heckert i Griswold, 1993). La producció d'andrògens i espermatozoides té lloc en dos compartiments dins del testicle. Els espermatozoides es produeixen dins els túbuls seminífers en estreta associació amb les cèl·lules de Sertoli, mentre que els andrògens són sintetitzats en els espais intersticials, on es localitzen les cèl·lules de Leydig. Aquests dos compartiments estan separats estructural i fisiològicament per barreres cel·lulars, que es desenvolupen durant la pubertat. Aquestes barreres constitueixen la barrera hemato-testicular (Cupps, 1991).

Fent una secció del testicle podem observar l'estructura interna d'un túbul seminífer i de l'espai intersticial (fig.1).

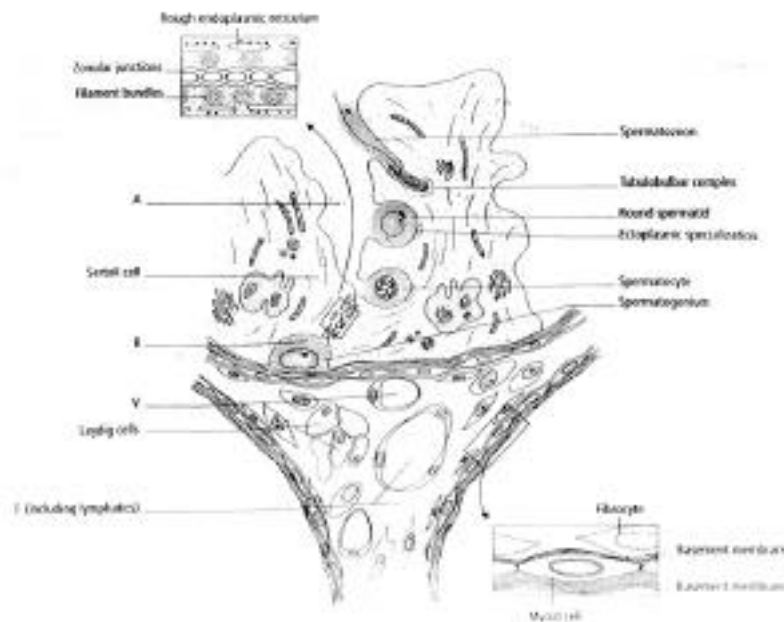


Fig. 1 Estructura d'un túbul seminífer. V compartiment vascular. I compartiment intersticial. B compartiment basal. A compartiment adluminal.

S'observen 4 compartiments diferents: vascular, intersticial, basal i adluminal. Una membrana basal que conté cèl·lules mioides així com fibroblastes, separa l'espai intersticial i els compartiments basals. En l'espai intersticial es localitzen els vasos limfàtics i les cèl·lules de Leydig. Dins els túbuls es troben els compartiments basal i adluminal. Aquests compartiments estan separats per complexos d'unió *gap*, que mantenen unides a les cèl·lules de Sertoli. En el compartiment basal es troben les espermatogònies, mentre que, en el compartiment adluminal es troben els espermatòcits, les espermatides rodones i els espermatozoides, en íntim contacte amb les cèl·lules de Sertoli mitjançant unions especials (Cupps, 1991).

1.2 Procés espermatogènic

El procés mitjançant el qual les espermatogònies donen lloc als espermatozoides és conegut amb el nom d'espermatogènesi.

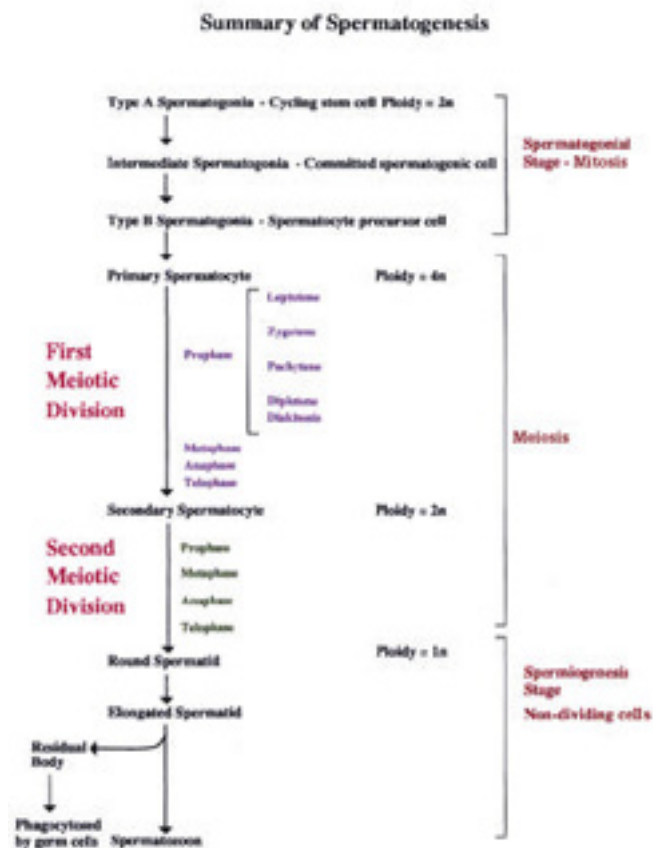


Fig. 2. Resum esquemàtic de l'espermatogènesi.

L'espermatogènesi (fig. 2) té lloc en els túbuls seminífers i es pot dividir en tres fases, basant-se en consideracions funcionals (Johnson, 1995):

a) Espermatòcitogènesi o proliferació mitòtica.

Existeixen 3 tipus d'espermatogonies: primordials, proliferatives i diferenciades. Les espermatogonies primordials són relativament resistents a diferents agressions i sovint sobreviuen quan d'altres tipus cel·lulars han estat eliminats (Huckins, 1978). La seva infreqüents divisions contribueixen a la seva resistència a moltes substàncies que afecten a varies fases del cicle cel·lular. Les espermatogonies proliferatives i diferenciades experimenten una proporció major de mitosi i, consegüentment, són més susceptibles a agents que afecten l'espermatogènesi. Durant aquesta fase les espermatogonies tipus A pateixen fins a 6 mitosis, i formen les espermatogonies A_{1-4} , l'espermatogonia tipus intermedi, i l'espermatogonia B (totes diferenciades), que finalment donarà lloc a un tipus cel·lular haploid, l'espermatòcit primari.

b) Fase meiòtica.

Les cèl·lules haploides formades amb la divisió de les espermatogonies B són els espermatòcits en fase de preleptotè (PI). Aquesta fase comporta dues divisions meiòtiques. En la primera divisió meiòtica, profase, cada PI experimenta tota una sèrie de canvis morfològics, amb canvis de grandària tant de la cèl·lula en si com del seu nucli (Russell, 1978). Els canvis nuclears són la base morfològica de la seva subdivisió durant la profase meiòtica, així els diferents estats madurats d'aquesta divisió meiòtica serien leptotens (L), zigotens (Z), paquitens (P) i diplotens (Di) respectivament. Aquestes últimes, són els espermatòcits primaris més grans i també el tipus cel·lular més gran de les cèl·lules germinals. El resultat d'aquesta primera divisió meiòtica són dos espermatòcits secundaris per cada PI, cadascun dels quals conté un nombre senzill de cromosomes ($2n$) i cada cromosoma consta de dos cromàtides unides pel centròmer. A la segona divisió meiòtica aquests espermatòcits secundaris donaran lloc a espermàtides rodones haploides.

c) Espermiogènesi.

En aquesta fase, les espermatides rodones passen per diferents estadis, en els quals, té lloc una remodelació citoplasmàtica, i es desenvolupa el flagel, estructura que dota de moviment a l'espermatozoide i l'acrosoma, que conté el material genètic.

1.3 Estadis del cicle espermatogènic

La secció d'un túbul seminífer conté diferents tipus cel·lulars i cada tipus cel·lular està disposat concèntricament dins del túbul. Això fa que existeixin agrupacions de diferents tipus cel·lulars en una mateixa fase de desenvolupament (Parvinen i cols., 1986). Cada tipus cel·lular d'aquesta associació està morfològicament integrat amb els altres en els seus processos de desenvolupament. Això es defineix com associació cel·lular o estadi (Jonhson i cols. 1994). Aquests estadis tenen una composició constant de cèl·lules germinals i a la rata s'han designat 14 estadis (Parvinen i cols. 1972) (Fig. 3). Tots els estadis complerts i ordenats, els quals tenen lloc en un segment de l'epiteli en un temps determinat, conformen el cicle de l'epiteli seminífer, on es pot seguir el procés espermatogènic en el testicle (fig. 4).

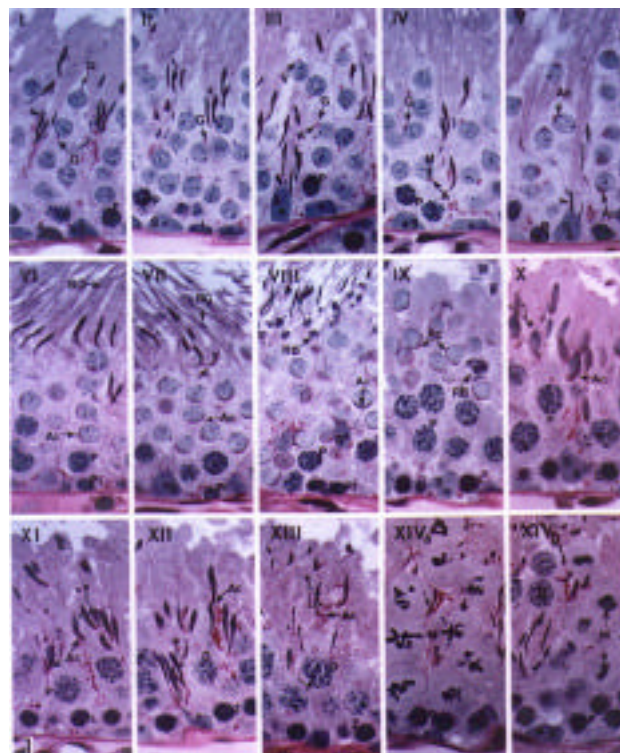


Fig. 3. Representació dels diferents estadis del cicle espermatogènic de la rata (Hess, 1990).

Per a que l'espermatogènesi, i conseqüentment, la producció d'espermatozoides siguin adequats, és necessari que hi hagi proliferació, maduració, diferenciació i mort cel·lular.

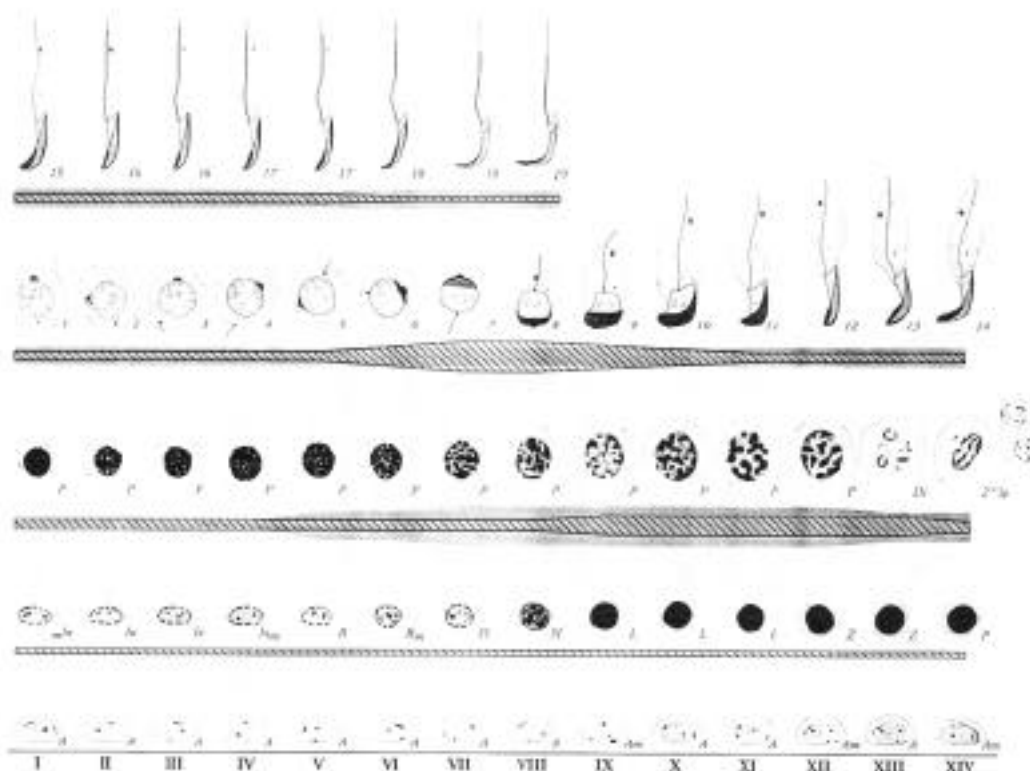


Fig. 4. Cicle espermatogènic de la rata en el túbul seminífer

1.4 Regulació hormonal de l'espermatogènesi.

La producció d'espermatozoides pel testicle està regulada amb molta cura mitjançant un nombre de mecanismes que, en definitiva, determinen la proliferació i supervivència de les cèl·lules germinals. El funcionament normal de l'espermatogènesi requereix un sistema hipotàlamic-hipofisari completament funcional, el qual generi les hormones gonadotròfiques FSH i LH.

Mitjançant l'acció de la LH sobre les cèl·lules de Leydig es produeix la Testosterona (T) en el testicle, la qual és molt important pel funcionament normal de l'espermatogènesi. Per mantenir una producció normal d'espermatozoides en la rata (Marshall i cols., 1983; Sun i cols., 1989) seria suficient d'un 10 a un 20% de la concentració normal intra-testicular de

testosterona i no es sap encara perquè aquesta hormona es produeix en concentracions tan altes.

La LH estimula l'esteroidogènesi mitjançant la seva unió al seu receptor de membrana, el qual pertany a la família de receptors de membrana acoplats a proteïna G (Griswold, 1993; Huhtaniemi, 1993) (Fig. 5).

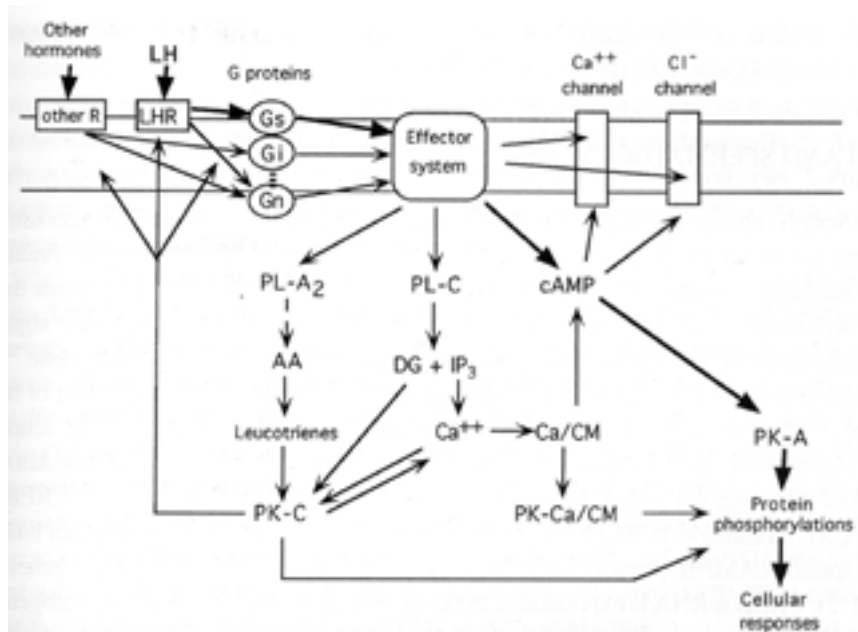


Fig. 5. Mecanisme d'acció de la LH.

El segon missatger utilitzat en la transducció de senyal de la LH és l'AMPc (Leung, 1992), i aquest camí està modulats per altres senyals (Fig 5). La resposta cel·lular final és l'estimulació del procés esteroidogènic a la cèl·lula de Leydig.

L'hormona FSH actua a nivell dels seus receptors a les cèl·lules de Sertoli. Aquests receptors són estructuralment molt similars als receptors de LH (Heckert, 1991). La unió de FSH al seu receptor de membrana acoblat a proteïna G dona lloc a nivells elevats d'AMPc activant l'adenilat ciclasa (Fig. 6).

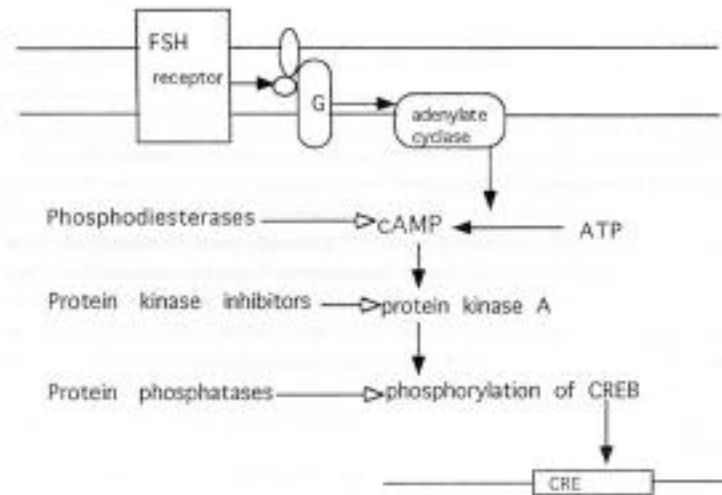


Fig. 6. Mecanisme d'acció de la FSH

L'activació d'aquesta via de transducció estimula una gran varietat de funcions en aquestes cèl·lules, com per exemple, la secreció de proteïnes com la transferrina, que està involucrada en la transferència de nutrients des de la cèl·lula de Sertoli cap a les cèl·lules germinals (Fritz, 1978). En resposta a la FSH, les cèl·lules de Sertoli també produeixen inhibina la qual, juntament amb la T, està involucrada en la regulació *feedback* de la funció pituïtària (Griswold, 1993). La secreció de FSH per la hipòfisi està regulada per l'inhibina, hormona secretada per les cèl·lules de Sertoli, que actua disminuint la seva secreció i per l'activina, hormona també produïda per les cèl·lules de Sertoli, que estimula la seva secreció.

1.5 Mort cel·lular programada

La Mort Cel·lular Programada (MCP) és un procés fisiològic de suïcidi cel·lular que s'activa en resposta a estímuls específics i que segueix un programa endògen i genèticament dirigit (Kerr i cols., 1972). La MCP juga un paper molt important durant el desenvolupament i l'homeostasi (Jacobson i cols., 1997). Entre les seves funcions cal esmentar la seva participació en el procés de remodelació tissular (Jacobson i cols., 1996), l'eliminació de cèl·lules embrionàries transitòries, la regulació del nombre final de cèl·lules d'un òrgan (Oppenheim, 1985; Hurler, 1988; Clarke, 1990), la participació en processos d'atròfia tissular hormono-depenent (Fidzianska i cols. 1990), així com en processos patològics deguts a alteracions gèniques o en resposta a tòxics cel·lulars (Barry i cols.

1990; Ijiri, 1989; Dipasquale i cols. 1991). L'apoptosi és un tipus morfològicament diferenciat de MCP. Existeixen una sèrie de trets que diferencien l'apoptosi de l'altre tipus de mort cel·lular més conegut que és la necrosi (Kerr i cols., 1972) (fig. 7).

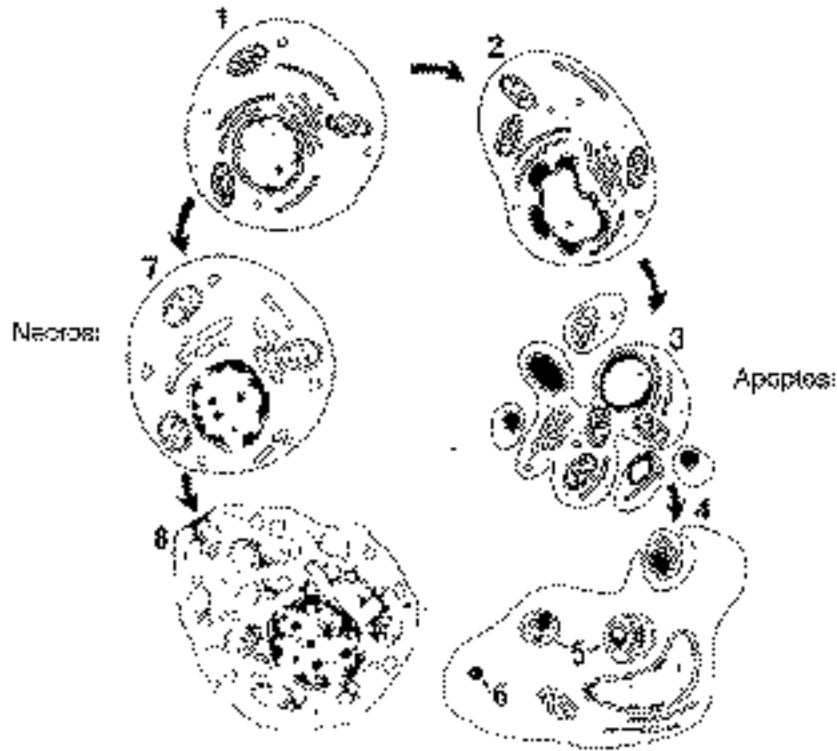


Fig. 7. Comparació entre Necrosi i Apoptosi.

En la necrosi es produeix una compactació irregular i una fragmentació a l'atzar de la cromatina, un augment del volum citoplasmàtic i una ruptura de totes les membranes cel·lulars amb alliberament de substàncies que activen la resposta inflamatòria. En l'apoptosi, les primeres manifestacions detectables en el microscopi electrònic inclouen la compactació i la marginació de la cromatina amb ruptura de la membrana nuclear, i condensació del citoplasma. Seguidament té lloc la fragmentació nuclear i la formació de cossos apoptòtics que són fagocitats per cèl·lules veïnes i digerits dins dels lisosomes, sense que hi hagi signes inflamatoris (Allan i cols., 1992) (Fig. 7).

Els canvis morfològics de l'apoptosi venen acompanyats d'una sèrie de canvis moleculars, com l'activació d'endonucleases endògenes específiques que provoquen la ruptura internucleosomal del DNA, donant lloc a l'aparició de fragments múltiples de 180 pb que

poden ser visualitzats amb un gel d'agarosa convencional, formant una imatge típica d'escala (Wyllie, 1990).

1.5.1 Regulació gènica de la mort cel·lular programada

Gran part del coneixement actual dels gens que participen en la mort cel·lular deriven dels estudis realitzats en el nemàtode *Caenorhabditis elegans* (Ellis i cols., 1991; Horvitz, 1994), mitjançant els quals s'ha pogut demostrar que un gran nombre de mutacions en diversos gens produeix l'abolició de la MCP. Aquesta va ésser la troballa definitiva que va permetre afirmar que la MCP és un procés actiu, sotmès a regulació gènica (Driscoll, 1992). Posteriorment, s'han identificat els gens homòlegs en mamífers (Yuang i cols., 1993; Hengartner i Horvitz, 1994).

a) Caspases

El primer gen descobert en *C. Elegans* va ser Ced-3, un gen que codifica una cistein-proteasa homòloga a l'enzim convertidor de la interleukina 1b (ICE), que intervé en la inducció de la MCP fisiològica (Yuang i cols., 1993).

Els substrats d'aquests enzims són residus àcid aspàrtic i la seva pròpia activació és a nivell dels seus propis residus específics àcid aspàrtic. És per això que han estat anomenades caspases, per cistein-aspartases (Alnemri i cols., 1996). Tenen una activitat molt específica i són anomenades les executores de l'apoptosi en el citosol (Cohen, 1997).

Algunes caspases es poden activar a elles mateixes o poden activar a unes altres, suggerint que probablement actuïn com una cascada proteolítica (Nagata, 1997). Les caspases medien la MCP per divisió seleccionada de proteïnes intracel·lulars, que es poden trobar en el nucli, en la làmina nuclear, en el reticle citoplasmàtic i en el citosol. En condicions fisiològiques es troben en forma de proenzims en el citoplasma, formades per un domini N-terminal o regulador, i dues subunitats de aproximadament 10 i 20 kD respectivament.

Per a la seva activació, es necessari un procés de proteolisi entre els dos dominis, de manera que es perd el domini regulador i té lloc la reassociació de les subunitats en forma de tetràmers, consistents en 2 heterodimers cadascun resultant de la reassociació de una

subunitat gran amb una petita. Aquesta proteolisi es du a terme en llocs consens per a la seva activitat. L'elevada especificitat de les caspases és deguda a que, per dur a terme la seva activitat proteasa, precisen reconèixer el residu aspàrtic i 5 aminoàcids específics cap el costat N-terminal des de l'aspàrtic. El pentapeptid òptim que és reconegut per cada caspasa és diferent, la qual cosa explica la diversitat de les funcions biològiques d'aquests enzims.

Existeix un nivell encara superior en el grau d'especificitat en les caspases, ja que no totes les proteïnes que contenen el pentapeptid òptim són substracte d'una caspasa en particular. Això implica, doncs que existeixen elements estructurals terciaris que poden influenciar el reconeixement del substrat per part de l'enzim (Thornberry, 1997). Aquest elevat grau d'especificitat de les caspases és el responsable de que, durant el procés apoptòtic, no es produeixi una digestió indiscriminada sinó selectiva.

Han estat identificades fins a 14 caspases diferents, numerades del 1 al 14 conforme s'han anat descobrint, i han estat classificades en dos grups, segons la seva funció (Fig.8).

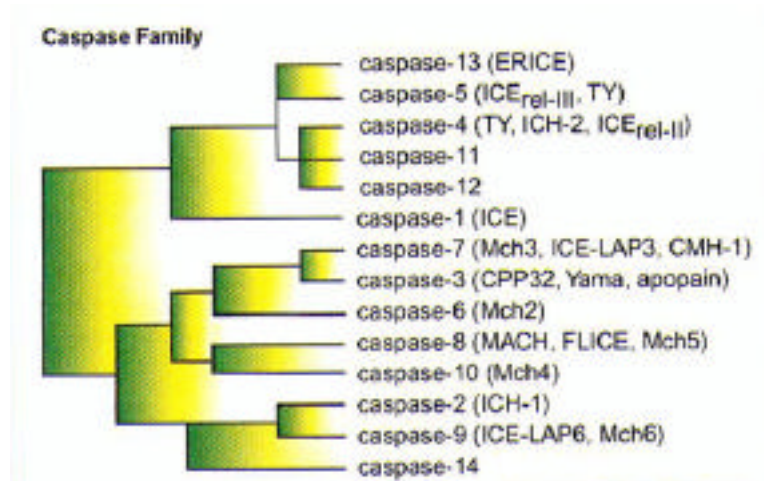


Fig.8. Família de caspases. (Apoptosis, catàleg 2000)

Així en un primer grup s'inclouen les que activen altres caspases (caspasa 1, 2, 4, 5, 8, 9 i 10), i en un segon grup les que duen a terme la funció d'executar l'apoptosi (caspasa 3, 6, 7 i 14), produint la proteolisi d'un conjunt ben definit de proteïnes que perden la seva funció.

Entre les més de 40 proteïnes que han estat identificades com substrats de les caspases, es troben les que protegeixen la cèl·lula enfront del procés apoptòtic, com són alguns

membres de la família de Bcl-2 (Xue, 1997; Cheng, 1997), proteïnes estructurals com les de la làmina nuclear (Takahashi, 1996; Orth, 1996), unes altres involucrades en la regulació del citoesquelet, en la reparació i replicació del DNA o en el *splicing* del RNA (Thornberry, 1998). El substrat de l'activitat proteolítica de les caspases millor caracteritzat és la poli(ADP-ribose) o PARP, una proteïna nuclear implicada en la reparació del DNA (Fig. 9).

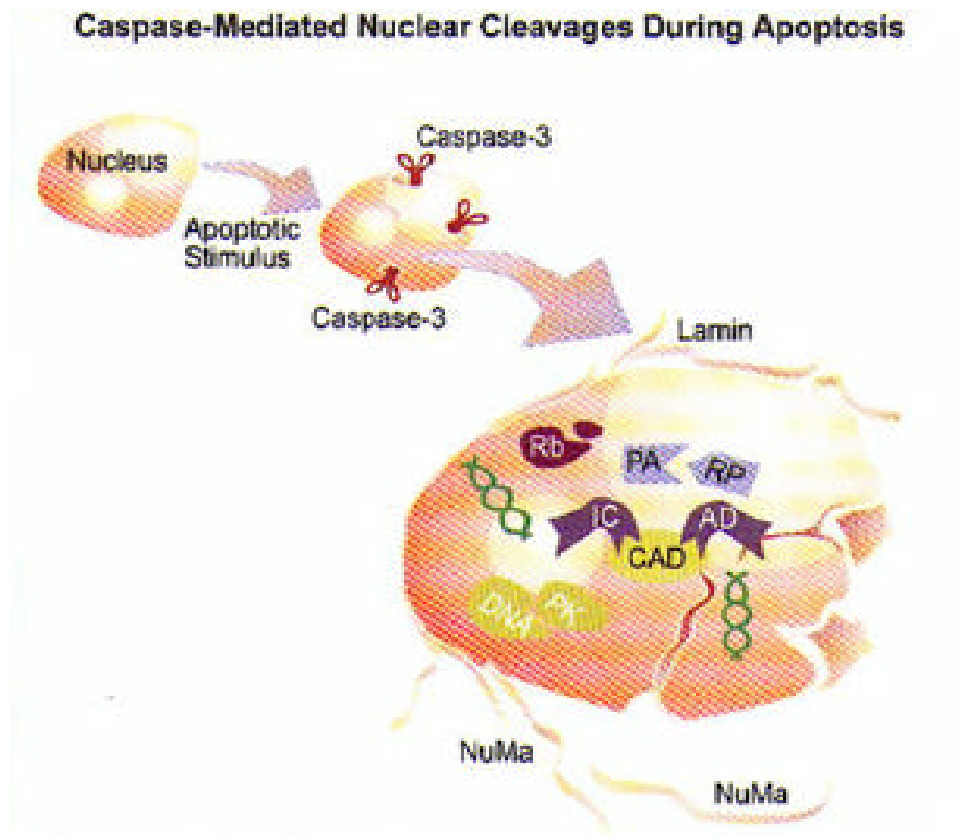


Fig. 9. Mecanisme d'acció de la caspasa-3. (Apoptosis, catàleg 2000)

En conjunt, les caspases executen una operació detalladament planejada en la que destrueixen el contactes amb les cèl·lules veïnes, reorganitzen el citoesquelet, impedeixen la reparació i replicació del DNA, interrompeixen el *splicing* del RNA, trenquen l'estructura nuclear i indueixen a la cèl·lula a produir senyals que marquin els cossos apoptòtics per la seva fagocitosi.

b) Família de Bcl-2

Un altre dels gens aïllats de *C. elegans* va ser *ced-9*, que actua inhibint la mort cel·lular en el nemàtode (Hengartner i Horvitz, 1994). En els mamífers el seu homòleg és *Bcl-2*, el gen activat per traslocació cromosòmica en el limfoma de cèl·lules B humanes (Tsujimoto i Croce, 1985). Aquest gen inhibeix la MCP i augmenta la supervivència cel·lular, sense modificar la proliferació (Vaux i cols., 1988).

El gen de *Bcl-2* codifica per una proteïna de 26 kD, que no conté formes estructurals que suggereixin com controla el procés apoptòtic. L'extrem C-terminal conté 21 aminoàcids que li donen caràcter hidrofòbic, necessari per la seva inserció en membranes (Chen-Leavy, 1990). S'ha demostrat que aquesta capacitat d'insertar-se en membranes està íntimament associada amb la seva capacitat de regular l'apoptosi (Hockenberry, 1990; Tanaka, 1993). Experiments de localització sub-cel·lular han confirmat que *Bcl-2* està situat a la membrana externa mitocondrial, a la membrana nuclear i al reticle endoplasmàtic (Monaghan, 1992; Krajewski, 1993).

S'han identificat tota una sèrie de gens homòlegs a *ced-9/Bcl-2*, que quedarien inclosos dintre de la família anomenada família de gens *Bcl-2*. En el moment actual es coneixen uns 15 gens homòlegs en els mamífers i alguns més en els virus (Adams i Cori, 1998). Els membres d'aquesta família es defineixen perquè contenen, al menys, un dels quatre dominis conservats (BH1 a BH4), coneguts com els dominis d'homologia *Bcl-2* (Fig. 10).

Alguns membres d'aquesta família, com *Bcl-2* o *Bcl-x_L*, inhibeixen la MCP, mentre que altres, com *Bax* o *Bcl-x_S*, la promouen. *Bcl-x_L* i *Bcl-x_S* son proteïnes produïdes per "splicing" alternatiu a partir del gen *Bcl-x* (Boise i cols., 1993). Els productes membres que promouen la supervivència contenen, al menys, BH1 i BH2 (Yin i cols., 1994). Entre els que promouen l'apoptosi hi ha dos grups bastant diferenciats.

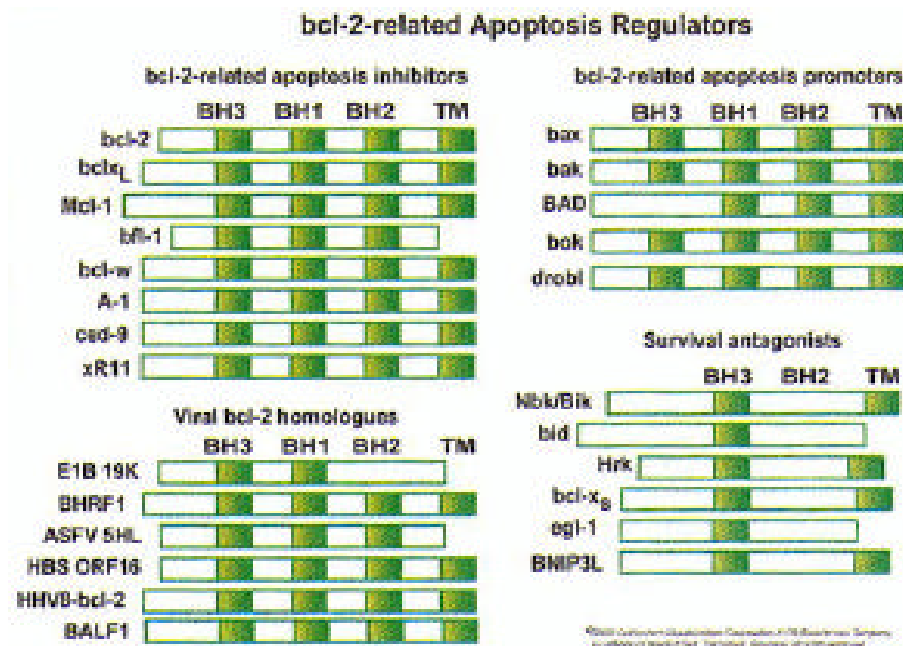


Fig.10. Dominis BH de la Família de proteïnes de Bcl-2. (Apoptosis, catàleg 2000)

Els membres d'un dels grups (Bax, Bak i Bok) contenen els dominis BH1, BH2 i BH3 i son molt semblants a Bcl-2. Contràriament, els membres de l'altre grup anomenat "assassins", tan sols contenen una petita part del domini BH3, essencial per aquesta funció (Adams i Cori, 1998). Un exemple d'aquest grup es Bik, que és capaç d'intercalar amb Bcl-2, Bcl-x_L o Bcl-x_S (Boyd, 1995). Els diferents membres de la família de Bcl-2 poden formar dimers amb ells mateixos, homodimers, o bé els poden formar amb altres membres de la família, heterodimers, afavorint l'activació o la inhibició de la MCP. Així, la relació entre inhibidors i activadors en una cèl·lula determina la susceptibilitat de la cèl·lula a experimentar MCP (Korsmeyer, 1995), malgrat que intervenen altres factors com per exemple la regulació per fosforilació (Gajewski i Thompson, 1996).

1.5.2 Mitochondries i apoptosi

Les mitochondries juguen un paper molt important en la regulació del procés apoptòtic. En resposta a determinats estímuls, les mitochondries alliberen el citocrom c, el qual és un cofactor necessari per l'activació de les caspases per Apaf-1 (Hu, 1998). Bcl-2 i els membres anti-apoptòtics relacionats amb la família de Bcl-2 prevenen la seva alliberació, mentre que Bax i els membres pro-apoptòtics homòlegs que contenen només el domini

BH3 promouen la seva alliberació, possiblement per mecanismes diferents (Li, 1998) (Fig. 11).

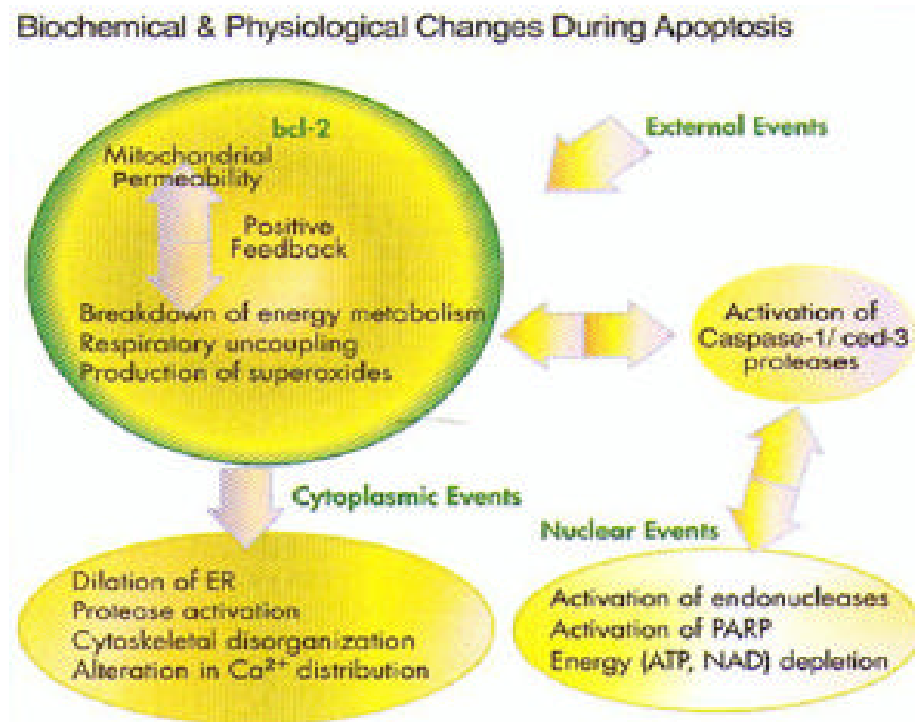


Fig. 11. Procés bioquímic i fisiològic durant l'apoptosi induïda pels gens de la Família de Bcl-2 (Apoptosis, catàleg 2000)

La majoria dels homòlegs pro-apoptòtics resideixen en el citosol i, en resposta a un estímul, transloquen cap a la membrana mitocondrial, on interactuen amb altres proteïnes per aconseguir l'alliberament del citocrom c. L'alliberació del citocrom c es dur a terme per diferents mecanismes:

- 1) Degut a la similitud estructural de la proteïna Bcl-x_L amb la toxina diftèrica formadora de porcs, s'ha pensat que els membres de la família de Bcl-2 podrien funcionar actuant com a porcs en la membrana externa mitocondrial (Muchmore, 1996).
- 2) S'ha postulat que Bax sigui capaç d'induir l'obertura del canal d'anions voltatge-dependents (VDAC) facilitant l'entrada d'aigua i soluts a les mitocondries, la qual cosa donaria lloc a l'alteració del potencial transmembrana, l'expansió del volum de la matriu mitocondrial i la ruptura de la membrana externa mitocondrial.

- 3) També s'ha proposat que Bcl-2 podria formar un canal alternatiu en la membrana externa mitocondrial, que permetria el trànsit de nucleòtids adenínics (Vander Heinden, 1997). S'han descrit evidències que demostren que el procés apoptòtic estaria associat al desequilibri mitocondrial en l'intercanvi de nucleòtids adenínics, resultant en un increment dels nivells d'ATP en la matriu mitocondrial i dels nivells citosòlics d'ADP, la qual cosa es previnguda per Bcl-2 i Bcl-xL (Vander Heinden, 1999). La perturbació de l'intercanvi de nucleòtids donaria lloc a la permeabilitat en la transició de soluts i a l'alliberament de citocrom c.

- 4) Un altre mecanisme d'alliberament de citocrom c seria l'obertura del porus de permeabilitat de membrana (PTP). L'obertura d'aquest porus permet l'influx de soluts inferiors a 1500 kD, donant lloc a la depolarització de la membrana interna. La obertura d'aquest porus està regulat per voltatge, matriu extracel·lular, pH, estrès oxidatiu, flux d'electrons, així com per dos dels constituents del porus, ciclofilina D i el translocador del nucleòtid adenina (ANT) (Fontaine, 1998; Crompton, 1998). La obertura d'aquest porus, doncs, produiria una desregulació del volum de la mitocondria i, donada la hiperosmolaritat de la matriu intramitocondrial i l'existència de crestes en la membrana interna de les mitocondries, l'expansió del volum de la matriu mitocondrial provocaria la ruptura de la membrana externa, alliberant al citosol les substàncies contingudes en l'espai entre elles, com el citocrom c (Petit, 1998; Zhuang, 1998).

1.5.3 Mitocondries i caspases

Existeix un camí d'activació de caspases anomenat camí mitocondrial, que és activat en resposta a diferents estímuls, que inclouen dany del DNA, inhibició de protein-kinases i pèrdua de senyals de supervivència. En aquest camí, Bax o Bid s'associen amb la mitocondria i dirigeixen la dissociació i posterior alliberament del citocrom c al citosol, on pot associar-se amb un altre factor clau, Apaf-1 (Li, 1997). Apaf-1 s'uneix al citocrom c, dATP o ATP, i forma un gran complex multimèric, anomenat apoptosoma, el qual també inclou molècules de caspasa-9 i 3 (Stennicke, 1999). La caspasa-9 s'activa quan s'uneix a Apaf-1, i així activada, promou el processament de la forma inactiva pro-caspasa-3 a la forma activa caspasa-3 (Stennicke, 1999).

Les caspases i una altra molècula pro-apoptòtica, el factor inductor d'apoptosis (AIF), són alliberades de la mitocondria juntament amb el citocrom c, en resposta a estímuls que indueixen permeabilitat a la membrana (Susin, 1996). Totes aquestes evidències demostren la íntima relació que existeix entre les mitocondries i els factors efectors del procés apoptòtic.

1.5.4 Apoptosi mitjançada per receptors de membrana

S'han realitzat molts estudis per elucidar quin és el programa de MCP i quins són els senyals que el posen en funcionament. S'ha demostrat que molts d'aquests programes inclouen una gran família de receptors i els seus lligands, que desencadenen el procés apoptòtic (Marcus i cols., 1997) (Fig. 12).

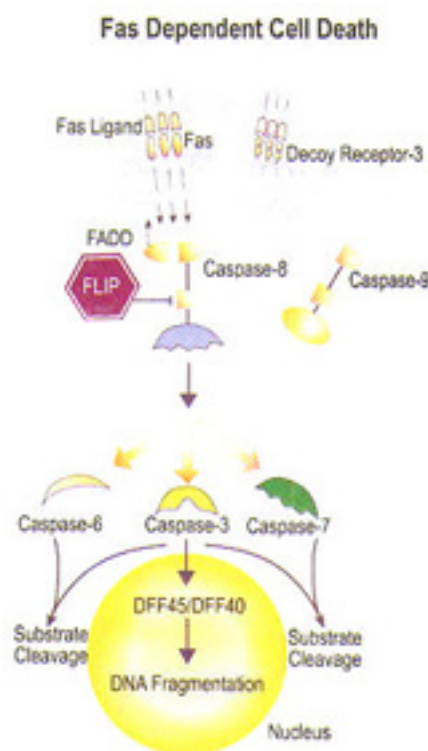


Fig. 12. Mecanisme d'acció de l'apoptosi mitjançada per receptors. (Apoptosi, catàleg 2000)

Aquests receptors pertanyen a la superfamília de receptors del Tumor Necrosis Factor (TNF) i estan caracteritzats per la presència de dominis extracel·lulars rics en residus cisteínics. Estudis *in vitro* han mostrat que el lligand de Fas (FasL) és crític en l'activació del procés apoptòtic a les cèl·lules T (Ashkenazi, 1998). Intracel·lularment contenen una

àrea d'estreta homologia necessària per transduïr el senyal de mort, que ha estat anomenat death domain (DD) (Marcus i cols., 1997). La utilització del sistema *yeast two-hybrid* amb la regió citoplasmàtica de Fas com a ham, va donar lloc a la identificació d'una molècula anomenada *Fas-associating protein with death domain* (FADD) o MORT-1, que conté un domini de mort al seu extrem C-terminal (Boldin i cols., 1995; Chinnaiyan i cols., 1995). FADD/MORT-1 és reclutat per Fas sota la seva activació i s'uneix a ell via interaccions específiques amb els dominis de mort (Kischkel, 1995).

La regió N-terminal denominada *death effector domain* (DED) seria la responsable de la conseqüent transducció de senyal. Altres membres d'aquesta família són per exemple, TNF-R1 i TNF-R2, CD40, CD27, i CD30 (Nagata i Golstein, 1995), TRADD (Hsu i cols., 1995) i RIP (Hsu i cols., 1996), però a diferència de FADD/MORT-1, aquests no portarien el domini DED, sent llavors el domini de mort el responsable de la mediació del procés apoptòtic. Per trobar la molècula que continua la transducció de senyal via unió a FADD/MORT-1, també es va fer servir el sistema *yeast two-hybrid*, utilitzant com ham l'extrem N-terminal del domini DED de FADD/MORT-1 (Boldin, 1996). La molècula així identificada, va ser anomenada originalment FLICE (FADD-like ICE protein), però actualment ha estat designada amb el nom de caspasa-8 (Alnemri, 1996). Aquesta proteïna conté 2 dominis DED a la regió N-terminal, a través dels quals s'uneix a FADD/MORT-1.

La regió C-terminal de la caspasa-8 està relacionada amb els membres de la família ICE, més específicament, a la subfamília de la caspasa-3, a la qual activa per hidròlisi (Boldin, 1996).

1.6 Mort cel·lular programada durant l'espermatogènesi

La producció d'esperma madur és un procés que inclou múltiples estadis de desenvolupament. El procés s'inicia a l'embrió de ratolí al voltant del dia 11,5 post-coit, quan les cèl·lules primordials germinals (PGC) colonitzen el tracte genital. Sota la influència de les cèl·lules de Sertoli, les PGC proliferen, algunes poden morir per apoptosi (Wang, 1998), mentre que les que queden es transformen en gonòcits. Els gonòcits romanen quiescents fins el moment del naixement, quan es reactiven i inicien el procés espermatogènic.

En animals joves, el desenvolupament del primer cohort de gonocits en esperma és conegut com la primera ona d'espermatogènesi. Aquesta es caracteritza per l'aparició seqüencial de tipus cel·lulars progressivament més madurs. Durant aquest procés, cadascuna de les cèl·lules germinals està estretament envoltada per una o més cèl·lules de Sertoli, les quals nodreixen les cèl·lules germinals i desenvolupen funcions d'adhesió i de transport (Russell, 1990), a més de produir factors importants en aquest i d'altres processos. Aquesta ona d'espermatogènesi ve acompanyada per un índex molt elevat d'apoptosi, que en el ratolí té un pic màxim al voltant de les dues setmanes després del naixement (Wang, 1998; Rodríguez, 1997).

Aquest procés sembla que està regulat per múltiples factors i podria reflexar un ajustament del nombre de cèl·lules germinals (Orth, 1988). S'ha estimat que durant l'espermatogènesi normal es poden perdre fins un 75% de les cèl·lules espermàtiques madures potencials (Tapanainen i cols., 1993). Estudis morfològics demostren que aquesta degeneració presenta les característiques d'apoptosi: compactació i marginació de la cromatina amb ruptura de la membrana nuclear, condensació del citoplasma, seguit de fragmentació nuclear i formació de cossos apoptòtics que són fagocitats per cèl·lules veïnes i degenerats dins dels lisosomes, sense que hi hagi signes inflamatoris (Allan i cols., 1992).

Pel que fa als canvis moleculars, s'observa el patró en escala al fer una electroforesi del DNA genòmic en un gel d'agarosa al 2%, així com la detecció del tipus cel·lular que pateix aquesta ruptura mitjançant la tècnica de TUNEL. La intensitat de la fragmentació, es a dir, el nombre de cèl·lules afectades, varia en les diferents etapes de la maduració testicular (Billig i cols., 1995).

Les cèl·lules de Sertoli i Leydig segueixen processos de proliferació i MCP, malgrat que ho fan en una proporció molt inferior a les cèl·lules germinals. No totes les cèl·lules germinals són susceptibles, amb la mateixa mesura, de patir apoptosi. S'ha descrit una correlació entre la probabilitat de seguir un procés d'apoptosi i l'estadiatge maduratiu del túbul seminífer, i també amb el tipus cel·lular en un determinat túbul (Tapanainen, 1993; Troiano, 1994).

En la rata adulta normal, apareixen cèl·lules germinals degeneratives en tots els estadis maduratius dels túbuls seminífers però amb una màxima incidència en els estadis XIV i I, i

mínima en el VII, i el tipus cel·lular més afectat és l'espermatòcit primari (Kerr, 1992). Contràriament, a la rata jove apareixen el doble de cèl·lules degeneratives en el estadi VII que en el XIV (Russell i cols., 1977).

1.6.1 Regulació hormonal i gènica de la funció gonadal i de la MCP en el testicle normal

La producció d'espermatozoides és un procés complex i altament organitzat. El correcte funcionament dels diversos tipus cel·lulars que integren el testicle depèn d'una precisa regulació hormonal així com d'una correcta funcionalitat i coordinació d'un gran nombre de factors de creixement i factors de transcripció.

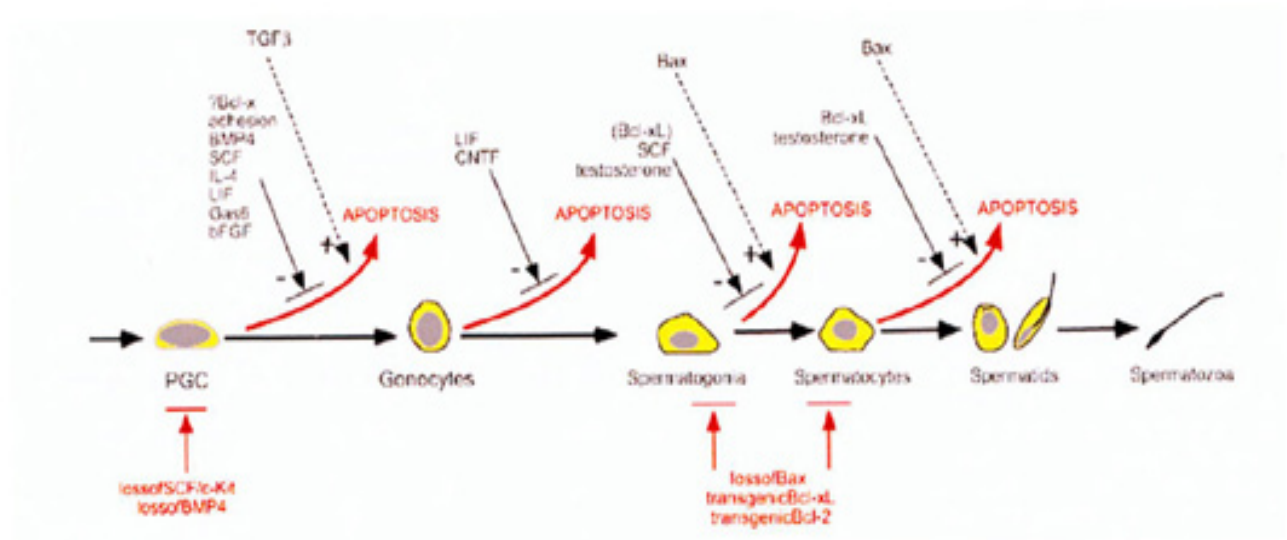
Tant el creixement i la diferenciació de les cèl·lules somàtiques testiculars, com el manteniment de l'espermatogènesi, estan regulats per les gonadotrofines hipofisiàries i els andrògens testiculars. Les cèl·lules de Sertoli responen a la Fol.litropina (FSH) i als andrògens secretats per les cèl·lules de Leydig en resposta a la Lutropina (LH), nodrint a les cèl·lules germinals i mantenint, d'aquesta manera, l'espermatogènesi. A més la cèl·lula de Sertoli secreta nombrosos factors com l'inhibina, les hormones anti-mullerianes, la somatomedina C i el factor de creixement transformant (TGF-beta), que també intervenen en la regulació del procés (Johnson i Barry, 1995).

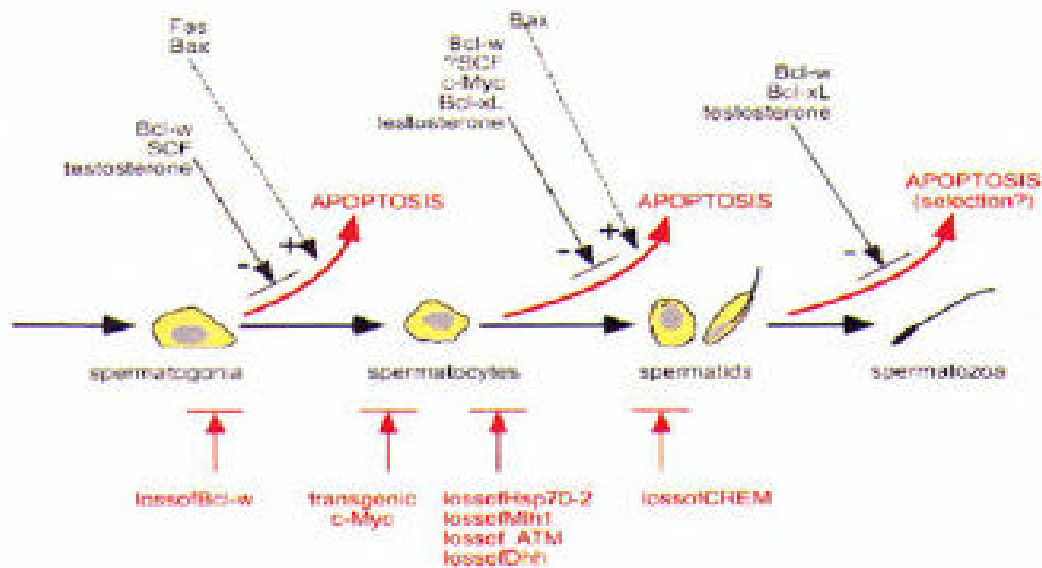
Existeixen diverses senyals paracrines que regulen el procés espermatogènic i promouen la supervivència de les cèl·lules germinals. Per exemple, les PGC expressen el receptor LIF a la seva superfície (Cheng, 1994), factor que promou la seva supervivència. Hi ha altres factors que també promourien la supervivència de les PGC, com Gas 6, interleucina-4 (IL-4) i SCF (*Stem cell factor*) (Matsubara, 1996; Cooke, 1996; Dolci, 1991).

Existeixen diferents treballs a la literatura que demostren la dependència hormonal que presenten els diferents tipus cel·lulars en el testicle. Un dels models més estudiats ha estat el de la rata immadura sotmesa a hipofisectomia. En aquests animals s'ha observat una important reducció del nombre cel·lular (Ghosh i cols., 1992) i un patró en escala típic d'apoptosi en l'electroforesi del DNA extret, tant de les cèl·lules intersticials com dels túbuls semminífers (Tapanainen i cols., 1993). El tractament amb FSH, hCG i testosterona suprimeix parcialment aquesta fragmentació del DNA. En situacions de privació

d'andrògens s'ha demostrat que són les cèl·lules germinals dels túbuls en estadi VII les primeres en degenerar i les que ho fan en major nombre (Sharpe i cols., 1988). Després de la supressió de LH/Testosterona en rates adultes, s'observa l'existència d'un nombre elevat de cèl·lules degeneratives en tots els estadis del cicle espermatogènic (Blanco-Rodriguez i Martinez-Garcia, 1996). En ambdós casos el tipus cel·lular més afectat és el pre-meiotic. Aquest fet reafirma la dependència hormonal del procés d'espermatogènesi, així com del procés d'apoptosi. Altres models descrits han estat el tractament de rates amb diversos antagonistes de les gonadotrofines, com azalina B (Billig i cols., 1995), cetrorelix (Brinkworth i cols., 1995) i amb substàncies tòxiques per un tipus cel·lular determinat, com l'ethane dimethane sulfonate (EDS) per a les cèl·lules de Leydig (Troiano 1994, Henriksen 1995), àcid metoxiacètic (Brinkworth i cols., 1995) o 2-metoxietanol (Ku i cols., 1995) per a cèl·lules germinals en estadi de paquitè.

En la identificació dels gens que regulen l'apoptosi durant l'espermatogènesi ha estat de molta utilitat el desenvolupament d'animals transgènics (Fig. 13 A i B).





B

Fig. 13. A i B) Estudi dels diferents gens que participen en el procés apoptòtic, així com el tipus cel·lular on actuen mitjançant l'ús d'animals transgènics i knockouts (Loveland, 2000).

Sorprenentment s'ha descrit alteració de la fertilitat en una quantitat considerable d'aquests animals. L'estudi de les seves gònades revela un fenotip comú consistent en aturada espermatogènica, apoptosi de cèl·lules germinals i formació de cèl·lules gegants multinucleades (Reventós i Munell, 1997).

Un exemple són els transgènics en els que s'ha produït una disrupció de gens involucrats en la reparació del DNA, com en el cas del gen PMS2. Aquests animals presenten una aturada meiótica en l'estadi de paquitè (Baker i cols., 1996).

El ratolí transgènic amb nivells reduïts del gen p53, s'observen espermatòcits primaris tetraploids que no han pogut completar la divisió meiótica, així com cèl·lules gegants multinucleades i cèl·lules germinals en degeneració (Rotter i cols., 1993).

El mutant pel gen que codifica per la heat shock protein-2 presenta un augment d'apoptosi en espermatòcits, absència d'espermàtides postmeiótiques i d'espermatozoides (Dix i cols., 1996).

Un altre animal transgènic és el ratolí deficient en CREM, factor de resposta a l'AMP cíclic, la funció del qual és activar transcripcionalment gens postmeiótics específics.

Aquest animal presenta aturada a l'espermioogènesi, amb presència de cèl·lules gegants multinucleades i apoptosi de cèl·lules germinals (Nantel i cols., 1996; Blendy i cols., 1996).

Un altre model és el ratolí transgènic per la proteïna transportadora d'andrògens (ABP), que presenta també aturada durant la primera divisió meiòtica, apoptosi de cèl·lules germinals en la fase de meiosi i cèl·lules gegants multinucleades (Munell i cols., 1996; Selva i cols., 2000).

També s'han detectat problemes de fertilitat en ratolins transgenics amb alteracions en la expressió d'alguns membres de la família Bcl-2. La expressió inapropiada de Bcl-2 en espermatogònies sota el control del promotor del factor d'elongació 1 de la cadena polipeptídica humana (EF-1) es causa d'acumulació i degeneració d'espermatogònies, suggerint que Bcl-2 regula l'apoptosi d'aquest tipus cel·lular durant l'espermatogènesi en els mamífers (Furuchi i cols., 1996).

El Knockout de Bax, creat per recombinació homòloga, presenta acúmul de cèl·lules germinals premeiòtiques atípiques, cèl·lules gegants multinucleades i mort cel·lular massiva (Knudson i cols., 1995).

La incidència d'apoptosi en el ratolí Knockout de Bcl-w, esdevé dramàticament elevada a les dues i quatre setmanes d'edat (Print, 1998). Els testicles dels ratolins Knockout de Bcl-w de sis setmanes d'edat, presenten moltes cèl·lules apoptòtiques, la majoria de les quals romanen unides en forma de simplastes.

La importància de la regulació del procés apoptòtic en fertilitat, ens ha dut per tant, a estudiar alguns dels gens i vies que regulen els mecanismes de mort de les cèl·lules germinals i de progressió de l'espermatogènesi, així com a la identificació de nous gens que puguin estar implicats.