

5. DISCUSSIÓ

En el present estudi s'ha evidenciat la participació d'alguns membres de la família de Bcl-2 en l'apoptosi de cèl·lules germinals de rates mascles adultes tractades amb EDS i MAA, així com la participació del receptor d'estrògens , del receptor d'andrògens i de la proteïna transportadora d'andrògens, en l'apoptosi de les cèl·lules germinals secundària a l'administració de MAA. Aquesta participació s'ha demostrat evidenciant la inducció dels respectius mRNAs, així com de les proteïnes resultants, la seqüència temporal d'aquesta inducció i la localització de les proteïnes en els túbuls seminífers. Tanmateix, mitjançant la tècnica del *Differential Display*, s'han aïllat dos gens nous, Rdes i HARP, involucrats en el procés apoptòtic induït pels dos tòxics.

5.1 Apoptosi durant l'espermatogènesi normal

Durant l'etapa postnatal, en el primer cicle espermatogènic, té lloc una ona apoptòtica massiva de les cèl·lules germinals en el testicle de la rata immadura, que és necessària pel desenvolupament normal de l'espermatogènesi de les rates adultes (Rodríguez i cols., 1997).

Posteriorment, durant l'espermatogènesi normal de les rates adultes, el procés apoptòtic és esporàdic i afecta principalment a les espermatogònies (Allan i cols., 1992). Els presents resultats confirmen aquest fet, ja que en les rates adultes utilitzades com a controls, no s'observa fragmentació del DNA al fer l'electroforesi del DNA genòmic en gel d'agarosa i, per la tècnica de TUNEL, es detecta alguna cèl·lula positiva aïllada. Aquests resultats coincideixen amb els descrits recentment per altres autors (Furuchi i cols., 1996; Mori i cols., 1997; Turner i cols., 1997).

5.2 Apoptosi induïda per l'administració d'EDS i MAA

Els models d'EDS i MAA ja han estat descrits com a inductors d'apoptosi a les cèl·lules germinals (Bartlett i cols., 1986; Brinkworth i cols., 1995). Es van escollir aquests models perquè són altament reproduïbles i perquè induïxen apoptosi per vies diferents, ja que l'objectiu general del present estudi és identificar els mecanismes comuns de regulació de l'apoptosi durant l'espermatogènesi.

L'EDS induïx apoptosi mitjançant la toxicitat que exerceix sobre les cèl·lules de Leydig (Jackson i cols., 1977; Morris i cols., 1986). Els resultats presentats evidencien un patró en escala en el gel d'electroforesi i la presència de cèl·lules intersticials TUNEL-positives a les 24h després del tractament amb el tòxic, confirmant doncs aquest fet.

Darrerament s'ha pogut demostrar que la depleció d'andrògens ocasionat per la desaparició de les cèl·lules de Leydig en el model d'administració d'EDS provoca posteriorment una disminució dels diferents tipus cel·lulars en la majoria dels estadis del túbul seminifer, malgrat que ho fa preferencialment als estadis VII-VIII. (Troiano i cols., 1994; Henriksen i cols., 1995). El patró en escala observat en les mostres dels animals tractats amb EDS en el present estudi, així com l'anàlisi de la fragmentació de DNA "in situ" de les mateixes mostres, coincideixen en el fet que no només augmenta el fenomen d'apoptosi, sinó que és màxim als 7 dies després del tractament.

Altres models de depleció d'andrògens han demostrat la inducció d'apoptosi en les cèl·lules germinals en l'estadi VII del túbul seminifer així com els IV-X després d'aquesta supressió (Clermont i Morgentaler, 1955; Russell i Clermont, 1977; Dym i Madhwa Raj, 1977; Sharpe i cols., 1988; Bartlett i cols., 1989; Kerr i cols., 1993; Blanco-Rodriguez i Martinez-Garcia, 1996), evidenciant que aquests estadis són els més susceptibles.

El model d'inducció d'apoptosi per administració d'una dosi de 650 mg/kg de pes corporal de MAA a la rata adulta provoca, per toxicitat directe, la mort cel·lular programada de forma selectiva dels espermatòcits primaris en fase de paquitè a les 24 hores després de l'administració del tòxic (Bartlett i cols., 1988). Coincidint amb els resultats descrits a la literatura (Brinkworth i cols. 1995), els presents resultats demostren un increment massiu d'apoptosi a les 24h després de l'administració del tòxic, i això es fa palès per la presència d'un patró en escala d'intensitat considerable i l'aparició de gran quantitat d'espermatòcits primaris en fase de paquitè positius per la tècnica de TUNEL.

Altres autors han publicat que els primers indicis d'apoptosi en els espermatòcits primaris en fase de paquitè es manifesten des de les 12 hores de l'administració del tòxic (Clark i cols., 1997). Els resultats presentats demostren que els primers indicis d'apoptosi ja apareixen 9 hores després de l'administració del tòxic. Aquesta discrepància podria ser explicada per la via d'administració utilitzada, donat que Clark, fa servir la dosificació oral

(Clark i cols., 1997), mentre que en els nostres experiments, l'administració del tòxic es realitza per injecció intraperitoneal.

Dotze hores després de l'administració del tòxic, els estadis més afectats són del VIII al XIII (Clark i cols., 1997). Els comptatges de les cèl·lules positives per a la tècnica de TUNEL, no només corroboren aquests resultats, sinó que a més evidencien que els espermatòcits en fase de paquitè dels estadis IX-XII són els més afectats per l'acció del tòxic, que també s'afecten els espermatòcits en fase de paquitè dels estadis III-IV i que no apareixen alteracions a l'estadi VII.

5.3 Paper dels gens de la família Bcl-2 durant l'apoptosi induïda per tòxics en el testicle de la rata adulta

S'ha suggerit en diverses ocasions que els andrògens regulen els gens de la família de Bcl-2 (Rodríguez i cols., 1997; Bonkhoff i cols., 1998) encara que els mecanismes mitjançant els quals es duria a terme aquesta regulació no es coneixen. La primera ona d'espermatogènesi, que culmina abans de la maduresa sexual, ve acompanyada d'una ona d'apoptosi en les cèl·lules germinals, i coincideix amb l'expressió de grans quantitats de la proteïna Bax en les cèl·lules afectades (Rodríguez i cols., 1997). Quan la quantitat d'andrògens augmenta, coincidint amb l'arribada a l'edat adulta de la rata, l'expressió desapareix o disminueix fins a nivells basals segons aquests autors (Rodríguez i cols., 1997).

A diferència d'aquestes troballes, en els animals controls del present estudi s'ha demostrat l'expressió dels mRNAs de Bax, Bcl-2 i Bcl-x. Aquest fet podria respondre a la gran sensibilitat de la tècnica d'amplificació utilitzada.

S'ha demostrat que Bax és un dels responsables de l'apoptosi tant de les cèl·lules de Leydig com de les cèl·lules germinals induïda per l'administració d'EDS (Taylor, 1998; Woolveridge, 1998). Els mateixos autors han trobat augments d'expressió proteica de Bcl-2 per *Western blot* com a conseqüència de l'acció del tòxic. Els resultats aquí presentats recolzen aquestes troballes, ja que demostren la inducció dels mRNAs així com de les proteïnes Bax i Bcl-2 de manera seqüencial en el temps en els animals tractats amb EDS. Per immunohistoquímica, es demostra la presència de Bax i Bcl-2 en les cèl·lules de Leydig

que presenten una clara morfologia apoptòtica a les 24 hores de l'administració del tòxic. Posteriorment, coincidint amb l'augment d'apoptosi, es detecta immunotinció per Bax a espermàtides rodones i allargades, i també per Bcl-2 a espermatoïcits primaris, predominantment en fase de paquitè. La seqüència temporal de l'expressió del mRNA de Bax a les cèl·lules germinals mostra un pic màxim als 5 dies després de l'administració d'EDS. La proteïna també presenta aquest augment seqüencial, però el màxim s'observa als 7 dies després de l'administració del tòxic. En el cas de Bcl-2, aquest augment es presenta de forma menys acusada.

També s'ha suggerit que alguns membres de la família de Bcl-2, com Bax, Bak i Bcl-w, són responsables de l'apoptosi induïda per MAA a les cèl·lules germinals del testicle de rates adultes (Yan, 2000). Aquests autors demostren per *Western blot*, un augment en l'expressió de la proteïna BAX a les 12 hores després de l'administració. Els resultats aquí presentats no només evidencien aquest fet, sinó que a més demostren la localització de BAX i Bcl-2 a les cèl·lules que, per la tècnica de TUNEL, han estat detectades com apoptòtiques.

Degut a que MAA actua de manera ràpida sobre els espermatoïcits primaris en fase de paquitè, es van examinar els nivells dels mRNAs de bcl-2, bax, bcl-x_L i bcl-x_S durant les primeres hores d'administració del tòxic. En les cèl·lules germinals aïllades procedents dels testicles de les rates tractades amb MAA, es va observar un augment progressiu dels nivells de bcl-2, bax i bcl-x_L des de 3 fins a 12 hores després de l'administració del tòxic. Els nivells de bcl-x_S, tot i que van augmentar lleugerament, no van variar gaire respecte als controls.

Pel contrari, examinant l'expressió del gen bcl-x en les mostres procedents de cèl·lules totals del testicle, es va observar una resposta al tractament totalment diferent. L'expressió del mRNA de bcl-x_L va disminuir considerablement després de l'administració del tòxic, mentre que, inversament, el mRNA de bcl-x_S va experimentar un augment molt acusat de la seva expressió. Aquests resultats van ser corroborats per l'estudi de la variació d'expressió proteica de Bcl-x_{L/S} per *Western blot*, on es va poder observar una disminució progressiva de Bcl-x_L i un augment de Bcl-x_S, que va ser màxim a les 24 hores després de l'administració del tòxic.

El paper de l'augment d'expressió dels membres de la família de Bcl-2, tant dels que actuen com a pro-apoptòtics com dels que ho fan com anti-apoptòtics en models d'apoptosi massiva de cèl·lules germinals ha estat causa de controvèrsia. En el model d'EDS, s'ha postulat que l'augment de Bcl-2 podria provenir de les cèl·lules que sobreviuen (Woolveridge, 1998). Els resultats obtinguts en el present estudi de co-localització de BAX i Bcl-2 en els espermatoïcits primaris en fase de paquitè dels túbuls danyats fan poc probable aquesta hipòtesi.

S'ha demostrat que els membres de la família de Bcl-2 formen dimers entre ells mateixos, homodimers, o amb altres membres de la família, heterodimers. La naturalesa d'aquests homodimers i heterodimers, així com el balanç entre ells, determina el destí final de la cèl·lula que els expressa (Korsmeyer, 1995). Una possibilitat podria ser, doncs, que Bcl-2 formés heterodimers amb BAX en els túbuls més afectats pel tòxic i que això accelerés el procés apoptòtic com ja va ser demostrat en experiments "in vivo" per Oltvai i cols. (Oltvai i cols., 1993).

Una altra possibilitat seria que Bcl-2 actués com pro-apoptòtic en aquests models. Per exemple, estudis "in vitro" han demostrat que Bcl-2 és un substrat de la Caspasa-3, i que aquesta trenqués el domini C-terminal de Bcl-2 i el fa perdre la seva activitat anti-apoptòtica (Cheng i cols., 1997). A més, s'ha demostrat que el producte d'aquesta divisió té propietats pro-apoptòtiques (Cheng i cols., 1997). Utilitzant un altre model "in vivo" d'inducció d'apoptosi en cèl·lules germinals, la hipertermia testicular, s'ha observat també la sobreexpressió de la proteïna de Bcl-2 poques hores després de sotmetre el testicle a l'augment de temperatura (Yamamoto i cols., 2000).

L'augment d'expressió de bcl-x_S, així com la disminució de bcl-x_L en el model de MAA en les mostres de cèl·lules de testicle total, suggereix un possible paper d'altres cèl·lules diferents de les germinals, en el procés apoptòtic induït per aquest tòxic. Malauradament, actualment no existeixen anticossos específics per poder comprovar aquesta hipòtesi directament.

5.4 Paper de la Caspasa-3 com a executora de l'apoptosi induïda per l'administració d'EDS i MAA

Diversos investigadors han demostrat la presència de la Caspasa-3 en la fracció citoplasmàtica de cèl·lules en diversos teixits en forma de precursor inactiu, i la seva activació proteolítica durant el procés apoptòtic (Schlegel i cols., 1996; Wang i cols., 1996). En el present estudi es demostra la presència de nivells basals del precursor inactiu d'aquesta caspasa, tant a nivell de mRNA com de proteïna, en els testicles de totes les rates controls analitzades.

Per explicar la connexió entre els membres de la família de Bcl-2 i les Caspases, es va suggerir un model mitjançant el qual els membres pro-apoptòtics de la família de Bcl-2 podien estimularien l'activació de les Caspases després de rebre una senyal inductora d'apoptosi, i els membres anti-apoptòtics podrien prevenir aquesta activació (Rao i cols., 1997). Posteriorment, s'ha demostrat que l'activitat de les Caspases està regulada per la família Bcl-2 (Reed, 1997; Chao i cols., 1998; Adams i cols., 1998; Green i cols., 1998; Green, 1998). Utilitzant un model de torsió testicular, s'ha demostrat una sobreexpressió dels mRNAs de Bax i Caspasa-3 a les 24 hores d'aplicar la torsió (Lysiak i cols., 2000). En el model d'apoptosi de les cèl·lules de Leydig induït per l'administració del tòxic EDS, també ha estat demostrada la participació de la Caspasa-3 (Jong-Min i cols., 2000).

Els resultats presentats demostren la presència d'una de les formes actives de la Caspasa-3 a les 24 hores de l'administració d'EDS. També es demostra, per primera vegada, l'activació d'aquesta forma activa de 20 kd als 5 i 7 dies després de l'administració del tòxic així com l'augment en l'expressió del mRNA de la Caspasa-3 a les 24 hores i als 3, 5 i 7 dies després de l'administració del tòxic, fets que evidencien la participació d'aquesta proteïna en el complex procés d'apoptosi que té lloc en aquests model.

En el model d'apoptosi induïda per MAA, es demostra també, per primera vegada, un augment en l'expressió del mRNA de la Caspasa-3 des de les 6 fins a les 12 hores després de l'administració del tòxic, així com la seva activació a partir de les 9 hores d'administració del tòxic, per l'aparició de les dues formes actives de la proteïna.

5.5 Receptors esteroidals durant l'espermatogènesi

El mecanisme mitjançant el qual els andrògens regulen el procés espermatogènic encara no s'ha entès completament, malgrat que, el que si que es sap amb certesa, és que es necessiten uns nivells adequats d'andrògens per a que l'espermatogènesi es completi amb normalitat (Sharpe, 1994). Els andrògens realitzen les seves funcions mitjançant la seva unió al receptor d'andrògens (AR). La localització del tipus cel·lular on resideix aquest receptor ha estat motiu de controvèrsia.

Els primers estudis realitzats, van afavorir la hipòtesi de que tant les cèl·lules germinals com les cèl·lules somàtiques expressaven el receptor (Wright i cols., 1980). Altres investigadors, però, van ser incapaçs de localitzar-lo a les cèl·lules germinals (Anthony i cols., 1989). Estudis més recents, encara mantenen aquesta polèmica, uns localitzant-lo tant a cèl·lules somàtiques (cèl·lules de Sertoli, cèl·lules de Leydig i cèl·lules peritubulars) com a cèl·lules germinals (espermàtides allargades) (Vornberger i cols., 1994), i uns altres tan sols a les cèl·lules somàtiques (Bremner i cols., 1994).

El que si s'ha consensuat per tots els grups és que, l'expressió de l'AR a les cèl·lules de Sertoli és estadi dependent (Vornberger i cols., 1994; Bremner i cols., 1994). Durant el procés espermatogènic, l'expressió d'AR presenta un pic en els estadis VII-VIII, disminueix als estadis III-IV, i és mínima a la resta d'estadis del cicle espermatogènic (Bremner i cols., 1994). Aquests resultats suggereixen la regulació de l'espermatogènesi per part dels andrògens.

En el present estudi, s'ha pogut corroborar l'expressió estadi dependent durant l'espermatogènesi de la rata adulta. No s'ha trobat expressió d'AR a les cèl·lules germinals.

Recentment ha guanyat molta importància la idea de que els estrògens podrien tenir un paper important en la fertilitat masculina (O'Donnell i cols., 2001). L'acció dels estrògens es realitza mitjançant la seva unió a receptors esteroidals específics (Mangelsdorf i cols., 1995). Es coneixen dos receptors que medien l'acció dels estrogens, ER α (Jensen i cols., 1973) i ER β (Kuiper i cols., 1996; Tremblay i cols., 1997; Mosselman i cols., 1996).

Com en el cas de l'AR, existeix molta controvèrsia en la localització d'aquest receptor en el testicle de diferents espècies a l'edat adulta. A la rata, mitjançant estudis immunohistoquímics, a cèl·lules de Leydig s'ha localitzat ER α (Fisher i cols., 1997; Pelletier i cols., 2000; Saunders i cols., 2001), però no ER β (van Pelt i cols., 1999; Pelletier i cols., 2000). Per altra banda, s'ha pogut localitzar a les cèl·lules de Sertoli tant el mRNA com la proteïna d'ER α (Saunders i cols., 1998; van Pelt i cols., 1999; Shughrue i cols., 1998; Pelletier i cols., 2001), però no de manera estadi dependent (Saunders i cols., 1997; Saunders i cols., 1998). No existeixen treballs que demostrin l'expressió d'ER β en aquestes cèl·lules.

Sembla ser que ER α és l'únic receptor que s'expressa a les cèl·lules germinals, malgrat que s'ha descrit expressió d'ER β en espermatòcits i espermàtides (Pelletier i cols., 2000). Alguns autors localitzen ER α en espermatogònies tipus A (van Pelt i cols., 1999) i en espermatogònies tipus B (Saunders i cols., 1998), però d'altres no (van Pelt i cols., 1999). ER β també ha estat trobat en espermatòcits primaris en fase de paquitè i espermàtides rodones però no en espermàtides allargades (Saunders i cols., 1998; van Pelt i cols., 1999; Shughrue i cols., 1998).

En el present estudi, hem pogut trobar expressió del mRNA d'ER α tant en mostres procedents de cèl·lules germinals aïllades com de cèl·lules totals de testicle de rates control. Mitjançant estudis immunohistoquímics, utilitzant dos anticossos comercials diferents, s'ha localitzat la proteïna a cèl·lules de Sertoli sense cap patró estadi dependent, resultats que coincideixen amb els trobats per Saunders (Saunders i cols., 1998). També hem localitzat la proteïna en espermatòcits primaris en fase de paquitè i en espermàtides rodones.

5.6 Paper dels receptors esteroidals en l'apoptosi induïda al testicle de la rata adulta

En el model d'EDS, la depleció d'andrògens és deguda a la mort de les cèl·lules de Leydig (Troiano i cols., 1994). En els resultats presentats, la disminució dels andrògens s'acompanya de la disminució d'expressió del mRNA i de la proteïna del receptor d'andrògens. Aquesta disminució és evident en els estudis realitzats per RT-PCR als dies 3 i 5 post-tractament i en els estudis realitzats per immunohistoquímica, on assoleix nivells

indetectables als dies 5 i 7 post-tractament. Ademés, la inducció d'apoptosi té lloc als mateixos tipus cel·lulars del testicle descrits en altres models de privació d'andrògens (Henriksen i cols., 1995; Blanco-Rodriguez i Martinez-Garcia, 1996).

Cal ressaltar que, a la immunohistoquímica, s'observa una inducció marcada d'AR a les cèl·lules de Sertoli 3 dies després d'haver administrat el tòxic. Aquest fet podria ser degut a un mecanisme compensatori inicial per part de les cèl·lules de Sertoli, per intentar mantenir la resposta al detectar una disminució en el nivell dels andrògens.

Pel que fa a l'expressió d'ER no s'han observat canvis significatius com a conseqüència del tractament amb EDS.

El tòxic MAA ha estat utilitzat per estudiar la regulació de l'espermatogènesi per part dels andrògens (Bremner i cols., 1994). En els animals exposats al tòxic 3, 7, 14, 21 i 24 dies, aquests investigadors no van observar canvis en el patró d'expressió d'AR comparant amb els animals control.

El present estudi ha servit per evidenciar l'existència de canvis en el patró d'expressió d'AR en els diferents estadis del cicle espermatogènic, amb l'aparició d'un pic d'expressió d'AR als estadis III-IV a les 6 i 9 hores després de l'administració del tòxic, i passant als estadis XI-XII després de 12 hores d'exposició al tòxic. A diferència dels estudis realitzats per Bremner (Bremner i cols., 1994), aquests s'han realitzat tenint en compte la rapidesa amb la qual el tòxic exerceix la seva acció sobre les cèl·lules germinals i s'han estudiat els possibles canvis produïts durant les primeres 12 hores d'exposició. Aprofitant la possibilitat d'utilitzar noves tecnològiques, com el *LCM*, hem estudiat aquestes variacions a nivell d'expressió de mRNA i de manera estadi específica, amb la conseqüent corroboració dels resultats obtinguts amb els estudis immunohistoquímics.

Amb anterioritat s'ha demostrat que el tòxic MAA no només té efectes sobre els espermatòcits primaris en fase de paquitè, sinó que també produeix canvis en l'expressió de diversos gens a les cèl·lules de Sertoli (Wang i cols., 2000). Per tal d'esbrinar si aquests canvis han estat produïts com a conseqüència de l'acció del tòxic directament sobre les cèl·lules de Sertoli, o bé són deguts al dany produït a les cèl·lules germinals, es van realitzar estudis "in vitro" de l'acció del tòxic en línies cel·lulars de Sertoli. Els resultats

obtinguts demostren que no hi ha canvis ni en l'expressió del mRNA ni de la proteïna d'AR després d'exposar aquestes línies cel·lulars al tòxic, fet que suggereix que la variació en el patró d'expressió d'AR és una resposta a la pèrdua de les cèl·lules germinals en el tubul seminifer.

Donat que l'ABP ha estat recentment relacionada amb l'apoptosi de les cèl·lules germinals del ratolí transgènic que sobreexpressa aquesta proteïna (Selva i cols. 2000), i que el MAA a més d'induir apoptosi a les cèl·lules germinals també provoca canvis en l'expressió d'AR, vam decidir estudiar quines variacions podria produir aquest tòxic en l'expressió d'ABP.

Els estudis d'expressió de mRNA en les mostres procedents de testicles sencers d'animals tractats amb MAA, juntament amb els realitzats a les mostres procedents dels túbuls seminífers capturats de manera estadi específica, i els estudis d'expressió de mRNA i proteïna a les línies cel·lulars sotmeses al tractament amb MAA, van posar de manifest una acció directe del tòxic en l'expressió d'ABP per part de les cèl·lules de Sertoli.

El fet que no aconseguíssim detectar expressió del mRNA d'ABP als estadis VII-VIII en els animals control, i posteriorment s'observés un augment progressiu de la seva expressió en aquest estadi a mida que augmentava el temps d'exposició al tòxic, va suggerir una possible acció protectora d'aquesta proteïna en front de l'acció del tòxic, ja que és en l'estadi VII on els espermatòcits primaris en fase de paquitè no pateixen apoptosi després de l'administració del tòxic.

La relació entre els receptors esteroidals i l'apoptosi ha estat objecte d'un extens anàlisi. En el cas específic de l'ER α però, existeixen poques dades al respecte. Tan sols alguns treballs realitzats a cervell descriuen el possible paper d'aquesta proteïna a l'apoptosi de neurones sota certes circumstàncies (Sawada i cols., 2000; Nilsen i cols., 2000). La falta d'expressió d'ER α en els espermatòcits primaris que degeneren per apoptosi després del tractament amb EDS, suggeriria que són necessaris els andrògens per la seva expressió.

En el present estudi demostrem un increment considerable del mRNA així com de la proteïna d'ER en relació amb el temps d'exposició al tòxic, apareixent pics d'expressió a les 9 i 12 hores respectivament, després de l'administració del MAA. L'augment de l'expressió del mRNA d'ER s'ha demostrat en els túbuls seminífers afectats capturats per lasser respecte als controls. A nivell de proteïna, hem estat capaços de localitzar un increment notable en la immunoreactivitat a l'ER en el citoplasma dels espermatòcits primaris en fase de paquitè dels túbuls seminífers afectats. També hem demostrat, per *Western blot*, un augment en l'expressió d'ER en les fraccions proteïques citosòliques i no en les nuclears. Per verificar els resultats obtinguts per *Western blot* i immunohistoquímica, s'han utilitzat anticossos de dues cases comercials diferents, i s'ha realitzat bloqueig amb el pèptid a partir del qual havien estat generats.

Aquests resultats han suggerit dues preguntes: la primera, si el tòxic MAA afecta directa i/o indirectament als nivells d'ER i, la segona, si l'ER està directament relacionat amb l'apoptosi dels espermatòcits primaris en fase de paquitè induïda per MAA. Per respondre a la primera pregunta, s'han realitzat experiments en col·laboració amb el Dr. McDonell, el qual ha posat ha punt un sistema d'activació de receptors esteroidals "in vitro" (Gaido i cols., 2000). Mitjançant aquest sistema hem demostrat que, "in vitro", el MAA per si sol actua com un lligant d'ER aconseguint nivells d'activació del receptor equiparables als assolits per l'estradiol, es a dir, que actuaria com un agonista i que, conjuntament amb l'estradiol, és capaç de triplicar l'activitat del receptor, fet que demostra una activitat sinèrgica molt elevada.

Respecte a la segona pregunta, es coneix que el tractament amb estradiol indueix l'apoptosi d'els espermatòcits primaris en fase de paquitè, i que aquestes cèl·lules són més sensibles a la degeneració als 5 dies del tractament en els estadis VII-VIII (Blanco-Rodriguez i Martinez-Garcia, 1996). Malgrat que en aquest estudi els canvis degeneratius van ser atribuïts a la supressió hormonal, el fet de que es trobessin un gran nombre de cèl·lules apoptòtiques en uns altres estadis, així com el descens en el nombre d'espermatòcits primaris en degeneració a l'estadi de metafase després de 15 dies de tractament, va suggerir als autors que l'efecte podria ser degut a l'acció de l'estradiol sobre els seus receptors mitjançant el mecanisme clàssic lligant dependent (Blanco-Rodriguez i Martinez-Garcia, 1996).

En el model del MAA, donada la rapidesa d'acció del tòxic i la localització citoplasmàtica d'ER en els espermatòcits primaris en fase de paquitè, el mecanisme clàssic d'acció mitjançant la unió a DNA i activació transcripcional dels gens en resposta a esteroides, seria poc probable. Una explicació podria ser que el MAA actués com un antagonista "in vivo" en comptes d'agonista com ho fa "in vitro". Resultats similars han estat demostrats pel fitoestrogen Coumestrol (Patisaul i cols., 1999).

Finalment, els resultats obtinguts en els experiments "in vitro", juntament amb les dades obtingudes en el ratolí transgènic d'ABP, on s'observen increments en l'expressió del mRNA d'ER i immunoreactivitat de la proteïna en el citoplasma dels espermatòcits primaris en apoptosi (Selva i cols., manuscrit en preparació), suggereixen que, o bé la localització de l'ER a nucli és imprescindible per la progressió de la meiosi i la seva manca produeix parada espermatogènica i apoptosi, o bé l'ER en el citoplasma de les cèl·lules germinals té una acció directa en apoptosi.

5.7 Nous gens involucrats en el procés apoptòtic

Diferents tècniques moleculars han estat utilitzades en l'aïllament de nous gens relacionats amb el procés apoptòtic induït per diferents tractaments inductors. Mitjançant la tècnica d'Hibridació Substractiva, han estat identificats nous gens que es sobreexpressen en resposta a l'estímul apoptòtic i d'altres que són inhibits (Wang i cols., 2000). L'ús de llibreries substractives de cDNA també ha donat lloc a la identificació de nous gens implicats en apoptosi (Bruyninx i cols., 1999). Un altre mètode utilitzat per trobar nous gens involucrats en processos apoptòtics ha estat la comparació de seqüències amb dominis relacionats amb funció apoptòtica i el disseny de sondes per tal de fer screenings de llibreries de cDNA (Conway i cols., 2000). La tècnica de *Differential Display* també ha estat utilitzada per trobar nous gens expressats durant l'espermatogènesi (Catalano i cols., 1997).

Amb la intenció de trobar nous gens involucrats en el procés apoptòtic, hem utilitzat aquesta darrera tècnica. Comparant les variacions d'expressió entre els RNAs de mostres procedents de cèl·lules germinals aïllades de testicles de rates control amb els RNAs de

mostres procedents de cèl.lules germinals aïllades de testicles de rates tractades amb 2 tòxics inductors d'apoptosi (EDS i MAA) que presenten mecanismes d'acció diferents, hem aïllat aquells RNAs que es sobreexpressen en els temps màxims d'exposició als dos tòxics alhora, eliminant aquells que només estan sobreexpressats en un o en altre per separat. D'aquesta manera, només els RNAs veritablement involucrats en el procés apoptòtic han estat aïllats. Tan sols dos dels diferents clons aïllats per aquesta tècnica han demostrat una veritable diferencialitat per *Northern blot* (clons A9 i C9).

El clon A9 presenta una elevada homologia amb Mdes, l'homòleg d'una desaturasa aïllada en espermatòcits degenerants de *Drosòfila* (Endo i cols., 1997), mentre que el clon C9 presenta una elevada homologia amb el gen HRP-1 de ratolí, un membre d'una família de factors de creixement procedents d'una línia cel·lular d'hepatoma (Izumoto i cols., 1997).

Mitjançant el *screening* d'una llibreria de cDNA de rata amb una sonda dissenyada a partir de la seqüència del clon A9, hem aïllat i identificat la seqüència codificant d'aquest clon. Aquesta seqüència presenta una llargada de 1391 pb, amb un *ORF* de 972 pb que codifica per una proteïna de 323 aminoàcids, d'un pes molecular predit de 37 kd. Tan el cDNA com la proteïna presenten un grau d'homologia molt elevat amb diferents homòlegs d'una proteïna de transmembrana identificada com a una desaturasa aïllada inicialment en espermatòcits primaris de *Drosòfila* (Endo i cols., 1996). Per aquest motiu hem designat aquest clon amb el nom de *Rattus norvegicus degenerative spermatocyte-like protein* (**Rdes**), i hem introduït la seqüència en el banc de dades *Genbank* amb el n° d'accés AY036902.

Mitjançant el disseny d'una parella d'encebadors, un complementari a la zona 3' continguda en el clon A9 i que presenta una homologia molt elevada (90%) amb l'*Hepatoma derived growth factor related protein 1- mouse*, i un altre dissenyat de manera que fos complementari a l'extrem 5' d'aquest mateix mRNA i que inclogués a la seva seqüència l'ORF complet d'aquest gen, i utilitzant cDNA procedent de testicles de rates tractades amb MAA, s'ha obtingut per PCR una única banda d'una grandària de 1,3 kb aproximadament, que juntament amb el fragment del clon C9 conformen una seqüència de 1512 pb. Aquesta seqüència conté un *ORF* de 891 pb que codifica per una proteïna de 296 aminoàcids, d'un pes molecular predit de 33 kd. El fet de presentar un grau d'homologia tan elevat amb la família de factors de creixement HDGF, d'haver estat localitzat per

hibridació “in situ” a les cèl·lules que degeneren i de presentar un domini format per tándems de Pro-Glu, que no contenen cap dels altres membres aïllats fins ara d’aquesta família, ens ha dut a considerar-lo un nou membre de la mateixa i anomenar-lo *Hepatoma derived growth factor Apoptosis Related Protein (HARP)*.

5.8 Desaturases i el seu possible paper en apoptosi

La funció principal de les desaturases és insertar dobles enllaços en posicions específiques de la cadena d’àcids grassos, regulant d’aquesta manera el grau de desaturació d’aquests (Jeffcoat i cols., 1984). En el transcurs dels últims anys se’ls ha descobert d’altres funcions (Endo i cols., 1996; Endo i cols., 1997; Cadena i cols., 1997).

Malgrat que un dels primers membres d’aquest grup de desaturases, des-1, ha estat implicat en l’inici de la meiosi dels espermatòcits primaris durant l’espermatogènesi de *Drosòfila* (Endo i cols., 1996) i que el seu homòleg en ratolí, Mdes, també ha estat implicat en aquest procés (Endo i cols., 1997), hi ha poca informació de la veritable acció d’aquest enzim a les cèl·lules germinals durant el procés espermatogènic.

El fet d’haver aïllat el mRNA de Rdes sobreexpressat en les cèl·lules germinals procedents de testicles de rates que han estat sotmeses a tractaments inductors d’apoptosi, i d’haver-lo localitzat no només en cèl·lules degenerants, sinó que també en cèl·lules somàtiques del testicle de rates control, ens porten a hipotetitzar que Rdes podria jugar un paper important en el procés apoptòtic.

L’excés en la funció d’alguns gens reguladors de la segona divisió meiòtica durant l’espermatogènesi, com el gen rux, dona lloc a una aturada meiòtica i a la degeneració dels espermatòcits primaris (Thomas i cols., 1994; Gönczy i cols., 1994). De la mateixa manera, la sobreexpressió de Rdes deguda a l’acció del tòxic podria donar lloc a un excés de la seva funció en la iniciació de la meiosi, i provocar una aturada en el procés espermatogènic i la conseqüent activació del mecanisme apoptòtic. Per confirmar aquesta hipòtesi, s’haurien de fer estudis d’expressió proteica així com de funcionalitat.

A l’igual que el seu homòleg humà, MLD o Hdes (Cadena i cols., 1997), Rdes no és exclusiu de testicle sinó que l’hem trobat expressat en gaire bé tots els teixits analitzats per

Northern blot. S'ha demostrat que la sobreexpressió de MLD provoca la inhibició de la biosíntesi de l'*Epidermal growth factor (EGF) receptor*, suggerint un paper d'aquesta desaturasa en la regulació del procés biosintètic d'aquest receptor (Cadena i cols., 1997).

EGF ha estat considerat important pel bon funcionament de l'espermatogènesi (Yan, 1998). La disminució en la biosíntesi del seu receptor, podria fer inviable la seva funció durant l'espermatogènesi i desencadenar el procés apoptòtic. Malauradament, la sobreexpressió de Rdes en els nostres models d'inducció d'apoptosi no va donar lloc a una inhibició de l'expressió del receptor d'EGF (dades no presentades), per la qual cosa aquesta no seria un camí viable d'acció de Rdes. Malgrat tot, de la mateixa manera que MLD regula la biosíntesi del receptor d'EGF a nivell de reticle endoplasmàtic, Rdes podria estar regulant la biosíntesi d'altres receptors importants pel procés espermatogènic i que són sintetitzats en el reticle endoplasmàtic de les cèl·lules. Serien necessaris llavors, estudis d'interacció proteica en el sistema de dos híbrids en llevat per tal d'esbrinar a quines proteïnes es capaç d'unir-se Rdes.

Les desaturases també han estat implicades en la conversió de les dihidroceramides en ceramides, lípids bioactius involucrats en processos de creixement cel·lular, diferenciació i apoptosi (Geeraert i cols., 1997). Aquesta podria ser una altra explicació per l'augment en l'expressió de Rdes observada en els models d'apoptosi estudiats.

El sistema mitjançant el qual les desaturases exerceixen aquesta acció consisteix en un sèrie de reaccions acoblades que transporten electrons des d'un cofactor donador d'electrons fins a l'oxigen, que actua com acceptor (Geeraert i cols., 1997). El cofactor que intervé en aquest procés és NADPH (Lee i cols., 1973). La ceramida un cop formada, podria ser la responsable de l'activació de Bax, teoria que concordaria amb els resultats obtinguts de sobreexpressió de bax en aquests models. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi, seria necessari la realització d'experiments que demostrassin l'implicació de les ceramides en aquests models, així com estudis "in vitro" mitjançant els quals es pogués demostrar que aquesta desaturasa intervingués en la conversió de la dihidroceramida en ceramida.

5.9 Possible paper d'un nou membre de la família de factors de creixement HDGF en el procés apoptòtic

El cDNA d'*HDGF* va ser purificat a partir de la línia cel.lular humana derivada d'hepatoma mitjançant l'aplicació d'un medi condicionant, HuH-7, i es va demostrar la seva activitat estimuladora de creixement en fibroblastes i cèl.lules d'hepatoma (Nakamura i cols., 1989). Recentment han estat clonats 3 nous membres d'aquesta família, HRP-1, HRP-2 (Izumoto i cols., 1999) i HRP-3 (Ikegame i cols., 1999).

Com els altres membres d'aquesta família de proteïnes, HARP conté una seqüència de 98 aminoàcids a l'extrem N-terminal anomenada domini PWWP, que podria jugar un paper molt important en les unions entre proteïnes o amb el DNA a nivell de nucli. La proteïna predita per HARP conté una senyal de localització a nucli (*bipartite NLS*). Aquesta senyal també ha estat trobada a les seqüències dels altres membres de la família. Mitjançant estudis immunohistoquímics, HRP-1 ha estat localitzat en el nucli d'espermatòcits primaris en fase de paquitè i espermatides rodones (Kuroda i cols., 1999). A més s'ha demostrat que HRP-3 pot translocar-se a nucli per exercir la seva funció (Ikegame i cols., 1999). Tot això fa pensar que HARP podria actuar principalment en el nucli.

Malgrat el seu alt grau d'homologia amb HRP-1, l'anàlisi per *Northern blot* ens ha mostrat que HARP s'expressa en un ampli ventall de teixits, i no ho fa exclusivament al testicle com HRP-1, encara que sembla que és en aquest teixit on s'expressa de manera més abundant. Ademés, en funció del teixit on s'expressa, s'han observat transcrits de diferent mida. La funció que pot tenir en aquests altres teixits queda oberta a investigació.

HDGF i HRP-3 han estat involucrats en processos de proliferació cel.lular (Izumoto i cols., 1999; Ikegame i cols., 1999). HRP-1 ha estat considerat com un gen important en la meiosi durant l'espermatogènesi (Kuroda i cols., 1999). Sorprenentment, en el present estudi hem aïllat un nou membre d'aquesta família a partir de dos models inductors d'apoptosi.

Gràcies als estudis de localització de la proteïna HRP-1 en els testicles sotmesos als tractaments inductors d'apoptosi hem pogut deduir que HARP no és l'homòleg de HRP-1, donat que no hem localitzat HRP-1 en les cèl.lules que degeneren. La demostració de l'augment de la seva expressió en els animals tractats amb els 2 tòxics per *Northern blot*,

juntament amb la localització del mRNA d'HARP tant en els espermatòcits primaris en fase de paquitè que degeneren després de l'administració de MAA, com a les cèl.lules de Leydig que degeneren degut als efectes de l'EDS, per hibridació "in situ", ens a suggerit que HARP és un nou membre de la família de factors de creixement HDGF i podria tenir un paper important en el procés apoptòtic.

Un fet diferencial entre HARP i la resta de membres de la família de proteïnes HDGF, és l'aparició d'un domini ric en tàndems Pro-Glu. Existeixen moltes proteïnes que contenen repeticions de dipèptids en tàndem. S'ha suggerit que aquests tàndems serien dominis d'activació de factors de transcripció (Mermod i cols., 1989). Alguns exemples d'aquestes proteïnes inclouen el receptor per la rianodina (Otsu i cols., 1990) i el factor de transcripció E1A (Lafreniere i cols., 1994), que ha estat implicat en processos de creixement, diferenciació i apoptosis (Breckenridge, 2000).

Per altra banda, altres autors han aïllat 2 nous cDNAs que codifiquen per proteïnes que presenten repeticions en tàndem de dipèptids Pro-Glu mitjançant el *screening* de llibreries de cDNA (Geertman i cols., 1996). Aquestes proteïnes contenen en la seva seqüència una senyal de localització nuclear (NTS) semblant a la que apareix en HARP. Ademés contenen 6 llocs potencials de fosforilació per la CK II, en comparació amb els 4 que presenta HARP. La CK II ha estat implicada en la regulació de successos nuclears per fosforilació de certes proteïnes nuclears com *c-myc*, *c-jun*, i *SV-40 large T-antigen* (Litchfield i cols., 1993). Malgrat totes aquestes dades, el paper d'aquests dominis encara no es coneix.

Malgrat que per demostrar la relació directe entre HARP i el procés apoptòtic, es fa necessari el desenvolupament de nous experiments, com l'obtenció d'un anticòs específic per poder localitzar la proteïna a les cèl.lules que degeneren, o l'estudi de models "in vitro", les dades obtingudes en el present estudi suggereixen un paper important d'aquest nou gen en els fenòmens moleculars del procés apoptòtic.

6. CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts en el present estudi es desprenen les següents conclusions:

- La mort cel.lular programada de les cèl.lules germinals té lloc en cèl.lules aïllades i de manera estadi-depenent en el testicle de la rata adulta.
- El tractament de la rata adulta amb EDS i.p. provoca un augment de la mort cel.lular programada a les 24 hores en les cèl.lules de Leydig i als dies 5 i 7 en les cèl.lules germinals.
- El tractament de la rata adulta amb MAA i.p. indueix la mort cel.lular programada en les cèl.lules germinals, majoritàriament espermatòcits primaris en fase de paquitè, començant a manifestar-se a les 9 hores i presentant un pic màxim a les 24 hores després d'haver administrat el tòxic.
- Els membres de la família de Bcl-2, Bax i Bcl-2 participen activament en la mort cel.lular programada induïda pels dos tòxics, co-existent en el mateix estadi tubular i presentant un curs temporal similar.
- La mort cel.lular programada induïda pel MAA en el testicle de la rata adulta provoca un augment en l'expressió del mRNA i de la proteïna Bcl-x_s i un descens en l'expressió del mRNA i de la proteïna Bcl-x_L, en altres tipus cel.lulars del testicle diferents de les cèl.lules germinals.
- La mort cel.lular programada induïda pels dos models en el testicle de la rata adulta es mediada per l'activació de la caspasa-3, tant en les cèl.lules de Leydig en el model d'EDS, com en les cèl.lules germinals en el model d'EDS i MAA.
- El tractament de la rata adulta amb EDS i.p. provoca un augment de l'expressió d'AR en les cèl.lules de Sertoli als 3 dies de la seva administració, seguit de la desaparició de la seva expressió als 5 dies.
- El tractament de la rata adulta amb EDS i.p. no provoca canvis significatius en l'expressió d'ER i ER .

- El tractament de la rata adulta amb MAA i.p. indueix canvis en l'expressió del mRNA i la proteïna d'AR i ABP, que es manifesten en forma de diferències en la seva distribució en funció de l'estadi del cicle espermatogènic.
- El tractament de línies cel·lulars de Sertoli TM4 i MSC-1 amb MAA provoca un augment en l'expressió del mRNA i la proteïna d'ABP a les 12 i 24 hores d'exposició al tòxic.
- El MAA presenta activitat estrogènica en experiments "in vitro" demostrada per la seva capacitat d'activar els elements de resposta en cèl·lules HepG2 transfectades amb ER .
- El tractament de la rata adulta amb MAA i.p provoca un augment en l'expressió del mRNA i de la proteïna d'ER a les cèl·lules germinals que degeneren.
- L'augment d'expressió de la proteïna d'ER es localitza en el citoplasma d'aquestes cèl·lules, tant per experiments immunohistoquímics com per *Western blot*.
- Rdes, l'homòleg d'un grup de desaturases que han estat involucrades en processos meiótics durant l'espermatogènesi, participa en l'apoptosi de les cèl·lules germinals.
- HARP, un nou membre de la família de factors de creixement *HDGF*, alguns dels quals han estat involucrats en processos nuclears durant l'espermatogènesi, participa en l'apoptosi de les cèl·lules germinals.
- Tant Rdes com HARP s'expressen en la majoria de teixits analitzats per *Northern blot*, però presenten una expressió més abundant en el testicle.

7. BIBLIOGRAFIA

Adams JM, Cory S 1998 The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 28;281:1322-6

Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N 1999 Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol* 13:1522-34.

Allan DJ, Harmon Bv, Roberts SA 1992 Spermatogonial apoptosis has three morphological recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif* 25:241-250.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J 1996 Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171

Anthony CT, Kovacs WJ, Skinner MK 1989 Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with a microassay that uses an affinity ligand. *Endocrinology* 125: 2628-2635

Ashkenazi A, Dixit VM 1998 Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308

Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC and Yao X 1996 Involvement of mouse mlh 1 in DNA mismatch and meiotic crossing over. *Nature Genetics* 332-336

Bartlett JMS, Kerr JB, Sharpe RM 1988 The selective removal of pachytene spermatocytes using methoxy acetic acid as an approach to the study in vivo of paracrine interactions in the testis. *J Andrology* 9:31-40.

Barry MA, Behnke CA and Eastman A 1990 Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 40: 2353-2362

Beato M, Klug J 2000 Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6:225-36

Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen N and Hsueh AJ 1995 Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136: 5-12

Blanco-Rodriguez J, Martínez-García C 1996 Induction of apoptotic cell death in the seminiferous tubule of the adult rat testis: assessment of the germ cell types that exhibit the ability to enter apoptosis after hormone suppression by oestradiol treatment. *Int J Androl* 19:237-247

Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E and Schütz G 1996 Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature* 380: 162-165

Boise LH, Gonzalez-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G, Thompson CB 1993 Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH and Wallach D 1995 A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270: 7795-7798

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV and Wallach D 1996 Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815

Bonkhoff H, Fixemer T and Remberger K 1998 Relation between Bcl-2, cell proliferation, and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. *The Prostate* 34: 251-258

Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B 1995 Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 11: 1921-1928

Breeckenridge DG, Shore GC 2000 Regulation of apoptosis by E1A and Myc oncoproteins. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10(3-4): 273-280

Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PTK 1994 Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135:1227-1234.

Brinkworth MH, Weinbauer GH, Schlatt S, Nieschlag E 1995 Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 105, 25-33

Bruyninx M, Hennuy B, Cornet A, Houssa P, Daukandt M, Reiter E, Poncin J, Closset J and Hennen G 1999 A novel gene overexpressed in the prostate of castrated rats: hormonal regulation, relationship to apoptosis and to acquired prostatic cell androgen independence. *Endocrinology* 140: 4789-4799

Cadena DL, Kurten RC and Gill GN 1997 The product of the MLD gene is a member of the membrane fatty acid desaturase family: overexpression of MLD inhibits EGF receptor biosynthesis. *Biochemistry* 36: 6960-6967

Callard GV, Jorgensen JC, Redding JM 1995 Biochemical analysis of programmed cell death during premeiotic stages of spermatogenesis in vivo and in vitro. *Dev Genet* 16:140-147

Catalano RD, Vlad M and Kennedy RC 1997 Differential display to identify and isolate novel genes expressed during spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 3: 215-221

Chao DT, Korsmeyer SJ 1998 BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16: 395-419

Chen-Leavy S, Clearly ML 1990 Membrane topology of the Bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated *in vitro*. *J Biol Chem* 265: 4929-4933

Cheng EH, Kirsh DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM 1997 Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278: 1966-1968

Cheng L, Gearing DP, White LS, Compton DL, Schooley K, Donovan PJ 1994 Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. *Development* 120: 3145-3153

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M and Dixit VM 1995 FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512

Chomzinsky P, Sacchi N 1987 Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159

Clark AM, Maguire SM, Griswold MD 1997 Accumulation of clusterin/sulfated glycoprotein-2 in degenerating pachytene spermatocytes of adult rats treated with methoxyacetic acid. *Biol Reprod* 57:837-846

Clarke PGH 1990 Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *And Embryol* 181: 195-213

Clermont Y 1972 Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52: 198-236

Cohen GM 1997 Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16

Cooke JE, Heasman J, Wylie CC 1996 The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cells numbers. *Dev Biol* 174: 14-21

Crompton M, Virji S, Ward JM 1998 Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258: 729-735

Cupps PT 1991 *Reproduction in Domestic Animals*, 4th edition. Academic Press, London

Deng G, Su JH, Ivins KJ, Van Houten B, Cotman CW 1999 Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. *Exp Neurol* 159:309-18

Dipasquale B, Marini AM and Youle RJ 1991 Apoptosis and DNA degradation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 1442-1448

Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH and Eddy EM 1996 Targeted gene disruption of Hsp 70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis and male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3264-3268

Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CL, Lock LF, Lyman SD, Boswell HS, Donovan PJ 1991 Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 352: 809-811

Drexler HC, Risau W, Konerding MA 2000 Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J* 14:65-77

Driscoll M 1992 Molecular genetics of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol* 23: 1327-1251

Dym M, Madhwa Raj HG 1977 Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. *Biol Reprod* 17: 676-696

Ellis RE, Yuang J and Horvitz HR 1991 Mechanisms and functions of the cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7: 663-698

Endo K, Akiyama T, Kobayashi S, Okada M 1996 degenerative spermatocyte, a novel gene encoding a transmembrane protein required for the initiation of meiosis in *Drosophila* spermatogenesis. *Mol Gen Genet* 253: 157-165

Endo K, Matsuda Y and Kobayashi S 1997 Mdes, a mouse homolog of the Drosophila degenerative spermatocyte gene is expressed during mouse spermatogenesis. *Develop. Growth Differ.* 39: 399-403

Fidzianska A, Goebel HH and Warlo I 1990 Acute infantile spinal muscular atrophy: muscle apoptosis as a proposed pathogenetic mechanism. *Brain* 113:433-445

Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM 1997 Immunolocalisation of oestrogen receptor- within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinol* 153: 485-495

Fontaine E, Erickson O, Ichas F, and Bernardi P 1998 *J Biol Chem* 273: 12662-12668

Foster PMD, Lloyd SC, Blackburn DM 1987 Comparison of the in vivo and in vitro testicular effects produced by methoxy-, ethoxy- and N-butoxyacetic acids in the rat. *Toxicology* 43:17-30.

Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y 1996 Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development* 122:1703-9

Gaido KW, Maness SC, McDonnell DP, Dehal SS, Kupfer D and Safe S 2000 Interaction of methoxichlor and related compounds with estrogen receptor and , and androgens receptors: structure-activity studies. *Molecular Pharmacology* 58: 852-858

Gajweski TF and Thompson CB 1996 Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 87: 589-592

Geeraert L, Mannaerts GP and Van Veldhoven PP 1997 Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochem J* 327: 125-132

Geertman R, McMahon A, Sabban EL 1996 Cloning and characterization of cDNAs for a novel proteins with glutamic acid-proline dipeptide tandem repeats. *Biochim Biophys Acta* 1306: 147-152

Gönczy P, Thomas BJ, DiNardo S 1994 Roughex is a dose-dependent regulator of the second meiotic division during *Drosophila* spermatogenesis. *Cell* 77: 1015-1025

Green DR and Kroemer G 1998 The central execution of apoptosis: mitochondria or caspases? *Trends Cell Biol* 8: 267-271

Griswold MD 1993 Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. In: *The Sertoli cell*. Russell LD, Griswold MD eds., Cache River Press, Clearwater, pp:493-508

Hall JM, McDonnell DP 1999 The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140:5566-78

Heckert L, Griswold MD 1991 Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 5: 670-677

Heckert L and Griswold MD 1993 Expression of the FSH receptor in the testis. *Recent Progress in the Hormone Research* 4: 61-77

Hengartner MO and Horvitz HR 1994 *C. Elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76: 665-676

Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M 1995 Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology* 136:3285-3291

Hess RA 1990 Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium; light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol Reprod* 43: 525-542

Hockenberry D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ 1990 Bcl-2 in a inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336

Hsu H, Xiong J and Goeddel DV 1995 The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-KB activation. *Cell* 81: 485-504

Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V and Goeddel D 1996 TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signalling complex. *Immunity* 4: 387-396

Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nuñez G 1998 Bcl-xL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4386-4391

Hubank M and Schatz DG 1994 Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22: 5640-5648

Huckins C 1978 The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 190: 905-926

Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ 1992 Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 201: 125-140

Huhtaniemi I 1993 Hormonal control mechanisms of Leydig cells. In: *The Molecular Biology of the Male Reproductive System.*, de Kretser DM ed., Academic Press, San Diego pp: 383-410

Hurle JM 1988 Cell death in developing systems. *Methods Achiev Exp Pathol* 13: 55-86

Ijiri K 1989 Apoptosis (cell death) induced in mouse bowel by 1,2-dimethyldiazine, methylazoxymethanol acetate, and gamma-rays. *Cancer Res* 49: 6342-6346

Ikegame K, Yamamoto M, Kishima Y, Enomoto H, Yoshida K, Suemura M, Kishimoto T and Nakamura H 1999 A new member of a hepatoma-derived growth

factor gene family can translocate to the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 81-87

Izumoto Y, Kuroda T, Harada H, Kishimoto T and Nakamura H 1997 Hepatoma-derived growth factor belongs to gene family in mice showing significant homology in the amino terminus. *Biochem and Biophys Res Commun* 238: 26-32

Jackson CM, Jackson H 1977 Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatogenic action of ethane dimethanesulphonate. *J Reprod and Fertility* 71: 393-401

Jacobson MD, Weil M and Raff MC 1996 Role of Ced-3/Ice family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol.* 133:1041-1051

Jacobson MD, Weil M and Raff MC 1997 Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354

Jeffcoat R and James AT 1984 In *Fatty Acid Metabolism and Its Regulation*, New Comprehensive Biochemistry 7: 85-112

Jensen EV, DeSombre ER 1973 Estrogen-receptor interaction. *Science* 182: 126-134

Johnson L 1994 A new approach to study the architectural arrangement of spermatogenic stages revealed little evidence of a partial wave along the length of human seminiferous tubules. *J Andrology* 15: 435-441

Johnson L 1995 Efficiency of Spermatogenesis. *Microscopy Research and Technique* 32: 385-422

Jong-Min K, Luo L and Zirkin BR 2000 Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulphonate. *Endocrinology* 141 (5): 1846-1853

Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR 1972 Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British-Journal of Cancer* 26: 239-257

Kerr JB 1992 Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil* 95:825-830

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH and Peter ME 1995 Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signalling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579-5588

Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ 1995 Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270:96-9

Korsmeyer SJ 1995 Regulators of cell death. *Trends Genet*:11:101-5

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler SJ, Fenton W, Reed JC 1993 Investigation of subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53: 4701-4714

Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, Reed JC 1994 Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 54, 5501-5507

Ku WW, Wine RN, Chae BY, Ghanayem BI and Chapin RE 1995 Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 134: 100-110

Kuiper GC, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930

Kuroda T, Tanaka H, Nakamura H, Nishimune Y and Kishimoto T 1999 Hepatoma-derived growth factor-related protein (HRP)-1 gene in spermatogenesis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 433-437

Lafreniere RG, Carrel L and Willard HF 1994 *Hum Mol Genet* 3: 1133-1139

Lee TC, Wykle RL, Blank ML and Snyder F 1973 *Biochem Biophys Res Commun* 55: 574-579

Leung PC, Steele GL 1992 *Intracellular signalling in the gonads. Endocr Rev* 13: 476-498

Li H, Zhu H, Xu CJ and Yuan J 1998 *Cell* 94: 491-501

Li H, Yuan J 1999 *Deciphering the pathways of life and death. Curr Opin Cell Biol* 11:261-266

Li P, Nijhawan D, Budihardjo Y, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X 1997 *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell* 91: 479-489

Litchfield DW and Lüscher B 1993 *Mol Cell Biochem* 128: 187-199

Lysiak JJ, Turner SD and Turner TT 2000 *Molecular pathway of germ cell apoptosis following ischemia/reperfusion of the rat testis. Biology of Reproduction* 63: 1465-1472

Macaya A, Munell F, Gubits RM, Burke RE 1994 *Apoptosis in substantia nigra following developmental striatal excitotoxic injury. Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8117-21

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM 1995 *The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell* 83: 835-839

Marcus R. Peter, Armin E. Heufelder and Michael O. Hengartner 1997 *Advances in apoptosis research. Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12736-12737

Marshall GR, Wickings EJ, Ludecke DK, Nieschlag E 1983 *Stimulation of spermatogenesis in stalk-sectioned rhesus monkeys by testosterone alone. J Clin Endocrinol Metab* 57: 152-159

Matsubara N, Takahashi Y, Nishina Y, Mukouyama Y, Yanagisawa M, Watanabe T, Nakano T, Nomura K, Arita H, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y 1996 A receptor tyrosine kinase, Sky, and its ligand Gas6 are expressed in gonads and support primordial germ cell growth or survival in culture. *Dev Biol* 180: 499-510

Mermod N, O'Neill EA, Kelly TJ and Tijan R 1989 *Cell* 58: 741-753

Monaghan P, Robertson D, Amos AS 1992 Ultrastructural localisation of Bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* 40: 1819-1825

Morris ID, Philips DM and Bardwin CW 1986 Ethane dimethanesulphonate destroys Leydig cells in the rat testis. *Endocrinology* 118: 709-719

Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K and Eddy EM 1997 *Developmental Dynamics* 208: 125-136

Mosselman S, Polman J, Dijkema R 1996 ER : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392: 49-53

Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, and Fesik SW 1996 *Nature* 381: 335-341

Munell F, Esteban C, Torán N, Larriba S, Reventos J 1996 Increased in situ end labelling of fragmented DNA in the seminiferous epithelium of the ABP Transgenic mice. *Proceedings of the testis workshop (B9)*

Nagata S 1997 Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365

Nagata S, Goldstein P 1995 The Fas death factor *Science* 267: 1449-1455

Nakamura H, Kambe H, Egawa T, Kimura Y, Ito H, Hayashi E, Yamamoto H, Sato J and Kishimoto S 1989 *Clin Chim Acta* 183: 273-284

Nandi S, Banerjee PP, Zirkin BR 1999 Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas? Biol Reprod 61:1 70-5

Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquillier D, LeMeur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M and Sassone-Corsi P 1996 Spermiogenesis deficiency and germ cell apoptosis in CREM-mutant mice. Nature 380: 159-162

Nilsen J, Mor G, Naftolin F 2000 Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. J Neurobiol 43:1 64-78

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME and Simpson ER 2001 Estrogen and Spermatogenesis. Endocrine Reviews 22 (3): 289-318

Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ 1993 Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 74: 609-619

Oppenheim RW 1995 Naturally occurring cell death during neural development. Trends Neurosci 8: 487-493

Orth JM, Gunsalus GM, Lamperti AA 1998 Evidence from Sertoli cell-depleted rats that spermatids numbers in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. Endocrinology 122: 787-794

Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM 1996 The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. J Biol Chem 271: 16443-16446

Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM and MacLennan DH 1990 J. Biol Chem 265: 13472-13483

Parvinen M and Vanha-Perttula T 1972 Identification and enzyme quantification of the stages of the seminiferous epithelial wave in the rat. Anat. Rec. 174: 435-450

Parvinen M, Vihdo KK and Toppari J 1986 Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *International Reviews in Cytology* 1: 115-151

Patisaul HB, Whitten PL, Young LJ 1999 Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17 β -estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. *Molecular Brain Research* 67: 165-171

Pelletier G, Labrie C, Labrie F 2000 Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 165: 359-370

Petit PX, Gubern M, Diolez P, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G 1998 Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett* 426: 111-116

Print CG and Loveland KL 2000 Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 22: 423-430

Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser D, Metcalf D, Kontgen F, Adams JM, Cory S 1998 Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *PNAS* 95: 12424-12431

Rao L and White E 1997 Bcl-2 and ICE family of apoptotic regulators: making a connection. *Current Opinion in Genetics and Development* 7: 52-58

Reed JC 1997 Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387: 773-776

Reventos J, Munell F 1997 Transgenic animal models in reproductive endocrine research. *Eur J Endocrinol* 136:566-580

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P 1997 An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 16, 2262-2270

Rotter V, Schwartz D, Almon E, Goldfinger N, Kapon A, Meshorer A, Donehaver LA and Levine A 1993 Mice with reduced levels of p53 protein exhibits the testicular giant cell degenerative syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9075-9079

Russell LD, Clermont Y 1977 Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec* 187:347-66

Russell LD 1978 Movement of spermatocytes from the basal to adluminal compartments of the rat testis. *Am J Anat* 148: 313-328

Russel LD, Ettlín RA, Hikim APS, Clegg ED 1990 *Histological and Histopathological Evaluation of the Testes*. Cleanwater, Florida: Cache River Press

Sassone-Corsi P 1997 Transcriptional checkpoints determining the fate of male germ cells. *Cell* 88:163-166

Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR 1997 Expression of oestrogen receptor (ER) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol* 154: R13-16

Saunders PT, Fisher JS, Sharpe RM, Millar MR 1998 Expression of oestrogen receptor beta (ER) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol* 156: R13-R17.

Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, Millar MR 2001 Differential expression of oestrogen receptor and proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod* 7: 227-236

Saunders PT, Fisher JS, Sharpe RM, Millar MR 1998 Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol* 156:3 R13-7

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, Akaike A and Shimohama S 2000 Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J.* 14: 1202-1214

Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin TT and Nicholson DW 1996 CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 271: 1841-1844

Selva DM, Tirado OM, Toran N, Suarez-Quian CA, Reventos J, Munell F 2000 Meiotic arrest and germ cell apoptosis in androgen-binding protein transgenic mice. *Endocrinology.* 141:1168-77

Sharpe RM, Donachie K, Cooper I 1988 Re-evaluation of the intratesticular level of testosterone required for quantitative maintenance of spermatogenesis in the rat. *J Endocrinol* 117: 19-26

Sharpe RM, Maddocks S, Kerr JB 1990 Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *Am J Anat* 188: 3-20

Sharpe RM 1994 Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The physiology of reproduction*, 3rd ed. New York: Raven Press; 1363-1434

Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ, Merchenthaler I 1998 Comparative distribution of estrogen receptor- α (ER- α) and beta (ER- β) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 63: 498-504

Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM and Salvensen GS 1999 *J Biol Chem* 274: 8359-8362

Suárez-Quian CA, Goldstein SR and Bonner RF 2000 Laser Capture Microdissection: A new tool for the study of spermatogenesis. *J Andrology* 21 (5): 601-608

Sun YT, Irby DC, Robertson DM, de Kretser DM 1989 The effects of exogenously administered testosterone in spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 125: 1000-1010

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G 1996 Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184: 1331-1341

Syed V, Hecht NB 1998 Rat pachytene spermatocytes down-regulate a polo-like kinase and up-regulate a thiol-specific antioxidant protein, whereas sertoli cells down-regulate a phosphodiesterase and up-regulate an oxidative stress protein after exposure to methoxyethanol and methoxyacetic acid. *Endocrinology* 139:3503-11

Takahashi A, Musti PI, Martins LM, Poirier GG, Moyer RW, Earnshaw WC 1996 CrmA/SPI-2 inhibition of a endogenous ICE-related protease responsible for lamin A cleavage and apoptotic nuclear fragmentation. *J Biol Chem* 271: 32487- 32490

Tanaka S, Saito K, Reed J 1993 Structure-function analysis of the apoptosis-suppressing bcl-2 oncoprotein: substitution of a heterologous transmembrane domain restores function to truncated bcl-2 proteins. *J Biol Chem* 268: 10920-10926

Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW 1993 Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular survival factors. *Mol Endocrinol* 7:643-650

Taylor MF, Woolveridge I, Metcalfe AD, Streuli CH, Hickman JA and Morris ID 1998 Leydig cell apoptosis in the rat testes after administration of cytotoxin ethane dimethanesulphonate: role of the Bcl-2 family members. *J Endocrinology* 157: 317-326

Thomas BJ, Gunning DA, Cho J, Zipursky SL 1994 Cell cycle progression in the developing *Drosophila* eye: roughex encodes a novel protein required for the establishment of G1. *Cell* 77: 1003-1014

Thornberry NA, Rano TA, Peterson PT, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW 1997 A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 17907-17911

Thornberry NA, Lazebnik Y 1998 Caspases: Enemies within. *Science* 281: 1312-1316

Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V 1997 Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11: 353-365

Troiano L, Faustini Fustini M, Lovato E, Frasoldati A, Malorni W, Capri M, Grassilli E, Marrama P, Franceschi C 1994 Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Com* 202:1315-1321

Tsujimoto Y and Croce C 1985 Analysis of the structure, transcripts and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5214-5218

Turner TT, Tung KSK, Tomomasa H and Wilson LW 1997 Acute testicular ischemia results in germ cell-specific Apoptosis in the rat. *Biology of Reproduction* 57: 1267-1274

Van Pelt AM, de Rooij DG, van der Burg B, van der Saag PT, Gustafsson JA, Kuiper GG 1999 Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology* 140: 478-483

Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB 1997 Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91: 627-637

Vaux D, Cory S, Adams J 1988 Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442

Vilagrasa X, Mezquita C, Mezquita J 1997 Differential expression of bcl-2 and bcl-x during chicken spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 47:26-9

Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA 1994 Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134:2307-16

Wang R-A, Nakane PK, Koji T 1998 Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* 58: 1250-1256

Wang W and Chapin RE 2000 Differential gene expression detected by suppression subtractive hybridization in the ethylene glycol monomethyl ether-induced testicular lesion. *Toxicological Sciences* 56: 165-174

Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS and Goldstein JL 1996 Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J* 15: 1012-1020

Weiss M, Vigier M, Hue D, Perrard Saporin MH, Marret C, Avallet O, Durand P 1997 Pre- and postmeiotic expression of male germ cell specific genes throughout 2 week co-cultures of germinal and Sertoli cells. *Biol Reprod* 57:68-76

Woolveridge I, Bryden AA, Taylor MF, George NJ, Wu FC, Morris ID 1998 Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short-and-long-term anti-androgen treatment. *Mol Hum Reprod* 4: 701-707

Woolveridge I, de Boer-Brouwer M, Taylor MF, Teerds KJ, Wu FC, Morris ID 1999 Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes. *Biol Reprod* 60:2 461-70

Wright WW, Frankel AI 1980 An androgen receptor in the nuclei of late spermatids in testes of male rats. *Endocrinology* 107: 314-318

Wyllie AH 1980 Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980 284: 555-556

Xue D, Horvitz HR 1997 *Caenorhabditis Elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell death inhibitor. *Nature* 390: 305-308

Yamamoto CM, Sinha Hikim AP, Huynh PN, Shapiro B, Lue Y, Salameh WA, Wang C and Swerdloff RS 2000 Redistribution of Bax is an early step in Apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by Mild Testicular Hyperthermia. *Biology of Reproduction* 63: 1683-1690

Yan W, Samson M, Jégou B, Toppari J 2000 Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bax/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocytes apoptosis in the testis. *Mol Endocrinol* 14:682-699.

Yin X-M, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ 1994 BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerisation with BAX. *Nature* 369: 321-323

Yuang J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM and Horvitz HR 1993 The *C. Elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 -converting enzyme. *Cell* 75: 641-652

Zhuang J, Dinsdale D, Cohen GM 1998 Apoptosis, in human monocytic THP-1 cells, results in the release of cytochrome c from mitochondria prior to their ultracondensation, formation of outer membrane discontinuities and reduction in inner membrane potential. *Cell Death Differ* 5: 953-962