

UCH-FC  
Biotecnología  
C 669  
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO



---

**INHIBICIÓN *IN VIVO* DE LAS CASPASAS Y SU EFECTO  
EN LA APOPTOSIS Y ESPERMATOGÉNESIS DE LA RATA**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**Verónica Andrea Codelia Arce**

Tutor: **Dr. Ricardo Moreno Mauro**

Patrocinante: **Dr. Miguel Aliende Conelly**

Unidad de Reproducción y Desarrollo, Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

---

Santiago de Chile, 2007



**“Inhibición *in vivo* de las caspasas y su efecto en la apoptosis y espermatogénesis de la rata”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**Verónica Andrea Codelia Arce**

**Dr. Ricardo Moreno Mauro.**  
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

**Dr. Cristián Gonzales-Billault**  
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

**Dra. Verónica Palma**  
Correctora

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

**Dr. Miguel Allende**  
Patrocinante

A horizontal line intended for a signature.

Santiago de Chile, 2007.





Cuando me dijeron que debía escribir una pequeña autobiografía, decidí focalizarla hacia mis estudios. Sin embargo, creo que a lo largo de toda mi vida, mi principal fuente de formación han sido mis padres y mi familia. Comencé mis estudios en el Colegio de Religiosas Filipenses, en donde desarrollé toda mi enseñanza básica y media. Complementariamente participé durante muchos años en el movimiento scout donde conocí amistades que perduran hasta el día de hoy. Al cumplir los 18 años y egresar del colegio tuve varias dudas acerca de cómo continuar y a qué profesión seguir, pasando por dos diferentes carreras antes de definirme y entrar a Ingeniería en Biotecnología Molecular. Tuve la suerte de poder emprender de manera temprana el quehacer en investigación científica en el Laboratorio del Dr. Ricardo Moreno, lugar que se transformó en mi segundo hogar y donde conocí maravillosos amigos. A pesar de que en un principio estaba llena de dudas, hoy estoy feliz de mis decisiones y segura de haber optado por la alternativa que más completa e integral me ha hecho como persona. A lo largo de estos años he conocido gente tanto dentro como fuera de mi ámbito profesional que sin duda me han ayudado en mi crecimiento. En estos momentos continúo mis estudios en el ámbito científico donde espero poder desarrollarme en el futuro.



*A mis padres.*

## Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a Dios y mis padres por ser el principal eje de mi vida.

Muy especialmente agradezco al Profesor Dr. Ricardo Moreno por recibirme en su laboratorio y ser mi guía paciente a lo largo de todo el desarrollo de mi tesis, tanto con su experiencia académica como con su alegría y optimismo frente a las todas circunstancias.

A mis hermanos y a Solange por estar siempre cuidándome y aconsejándome cuando lo necesité.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda en todos los momentos necesitados. En especial a Jaime Palominos y Don Pedro Cortés por su cariño y protección.

A mi amiga Constanza Cortés por su apoyo incondicional, a altas horas de la noche o tempranas horas de la mañana en el laboratorio (o fuera de él).

Finalmente, a mi amigo Pablo Cisternas, por su apoyo y ayuda a lo largo de todo el desarrollo de esta tesis de la cual eres parte. Gracias por tu paciencia infinita y cariño.

Muchas gracias.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	ii
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Espermatogénesis .....	1
1.2 Apoptosis .....	8
1.3 Vías de activación de caspasas.....	10
1.4 Regulación de la actividad de las caspasas .....	16
1.4.1 Control de la activación de las caspasas.....	16
1.4.2 Inhibidores farmacológicos de caspasas .....	18
1.5 Roles no apoptóticos de caspasas .....	21
1.6 Apoptosis durante la Espermatogénesis .....	22
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivos Generales.....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Material Biológico y procedimientos quirúrgicos.....	26
4.2 Reactivos .....	26
4.3 Obtención de testículos y extractos proteicos .....	29
4.4 Fijación e inclusión de testículos .....	30
4.5 Cortes en parafina.....	30
4.6 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick end-labeling (TUNEL)..	31
4.7 Inmunohistoquímica .....	32
4.8 Identificación de glúcidos y tinción con hematoxilina-eosina.....	33
4.9 Western Blots .....	33
4.10 Actividad de caspasas .....	34
4.11 Análisis morfométricos.....	35
4.12 Análisis de los datos .....	35



<b>5. RESULTADOS</b> .....	36
5.1 Cinética de activación de caspasas 3, 8 y 9 en ratas prepúberes. ....	36
5.2 Evaluación in vivo de la apoptosis con un inhibidor fluorescente.....	38
5.3 Inhibición farmacológica de caspasas a los 22 días de edad. ....	41
5.3.1 Efecto del inhibidor general de caspasas z-VAD-FMK. ....	41
5.3.2 Efectos del inhibidor de caspasa-8 .....	43
5.3.3 Efectos de la inhibición específica de caspasa-9. ....	44
5.3.4 Efectos del inhibidor E64d sobre la actividad de las caspasas. ....	46
5.4 Efectos de la inhibición de caspasas sobre la fragmentación del DNA.....	47
5.5 Efecto de la inhibición general de caspasas sobre la diferenciación de los túbulos seminíferos.....	50
5.5.1 Efectos de inhibición de caspasas sobre la organización general de los túbulos.....	50
5.5.2 Efectos de la inhibición de caspasas sobre diferentes marcadores de diferenciación celular de túbulos seminíferos.....	54
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>7. CONCLUSION Y PROYECCIONES</b> .....	65
<b>8. LITERATURA CITADA</b> .....	65



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ejemplos de inhibidores específicos de caspasas.....	20
Tabla 2: Lista de Anticuerpos utilizados en el estudio. ....	29
Tabla 3: Morfometría de testículos de ratas adultas inyectadas en su prepubertad (21 días) con el inhibidor general de caspasas z-VAD-FMK.....	53





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	La Espermatogénesis. ....	3
Figura 2:	Representación de los estadios del ciclo del epitelio seminífero de la rata. ....	6
Figura 3:	Principales vías de activación y regulación de la apoptosis. ....	13
Figura 4:	Familia de caspasas apoptóticas de mamífero. ....	16
Figura 5:	Cinética de activación de caspasas-3, -8 y-9 (c3, c8, c9 respectivamente) en testículos de ratas prepúberes de 21 a 24 días de edad. ....	37
Figura 6:	Distribución del inhibidor z-VAD-FITC en túbulos seminíferos de testículos de ratas de 22 días. ....	40
Figura 7:	Actividad enzimática de caspasa-3, -8 y -9 en testículos de ratas tras inyección intratesticular de z-VAD-FMK. ....	42
Figura 8:	Actividad enzimática de caspasas-3, -8 y-9 en testículos de ratas de 22 días tras la inyección de inhibidor de caspasa-8 (Ac-IEPD-CHO). ....	44
Figura 9:	Actividad enzimática de caspasas-3, -8 y-9 en testículos de ratas de 22 días tras la inyección del inhibidor específico de caspasa-9. ....	45
Figura 10:	Actividad enzimática de caspasas-3, -8 y-9 en testículos de ratas de 22 días tras la inyección de E64d. ....	47
Figura 11:	Células germinales TUNEL (+) en testículos de ratas de 22 días inyectadas con diferentes tratamientos. ....	48
Figura 12:	Organización celular en los túbulos seminíferos. z-VAD-FMK no causó efectos sobre la organización ni desarrollo de los túbulos seminíferos. ....	51
Figura 13:	La inhibición de caspasas no afecta el normal desarrollo de la espermatogénesis. ....	54
Figura 14:	z-VAD-FMK no afectó la distribución ni presencia de diferentes marcadores en testículos de ratas adultas. ....	56



## RESUMEN

La espermatogénesis es un proceso complejo a través del cual se forman espermatozoides haploides a partir de espermatogonias diploides. Varios estudios indican que un desbalance en los factores que controlan la muerte celular programada provoca infertilidad. La apoptosis es un tipo particular de muerte celular programada que se caracteriza por la activación de un grupo de cisteíno-proteasas llamadas caspasas. En ese sentido, se desconoce si la muerte de las células germinales es debida a la apoptosis o bien a otro tipo de muerte celular independiente de caspasas. Este es un punto crucial, debido a que en otros modelos de desarrollo se ha documentado que la activación de caspasas se encuentra asociada a la diferenciación y no a la apoptosis.

Es dentro de este marco conceptual que el objetivo principal de la presente memoria es determinar si la inhibición *in vivo* de las caspasas afecta la muerte celular o la progresión de la espermatogénesis de la rata. Para lograr este objetivo utilizamos inhibidores generales y específicos de las caspasas-8 y -9, las cuales se saben que participan en apoptosis en otros sistemas. Los resultados indicaron que la inhibición de las caspasas previene la apoptosis de células germinales que se produce en la pubertad de la rata (20-25 días de edad). Sin embargo, esta inhibición no afectó la progresión de la espermatogénesis, como se observó en testículos de ratas 42 días después del tratamiento con los inhibidores. Más aún, estas ratas fueron fértiles. Utilizando estos inhibidores específicos observamos que sólo el inhibidor general y el de la caspasa-8, pero no el de caspasa-9, inhibieron significativamente la apoptosis de células germinales. Esto sugiere que la principal vía de señalización de la apoptosis

involucra a la caspasa-8, la cual se activa por medio de receptores de muerte en la membrana plasmática.

En conclusión este trabajo sugiere que las caspasas inducen la apoptosis de células germinales. Estos resultados permitirán poder elucidar la o las posibles señales que inducen la apoptosis fisiológica de células germinales.

## ABSTRACT

Spermatogenesis is a complex process through which haploid spermatozooids are formed from diploid spermatogonias. Apoptosis is a particular type of programmed cell death, which is characterized by the activation of a group of cistein-proteases called caspases. Several studies indicate that a misbalance of the factors which control programmed cell death, provoke infertility.

However, it is not known whether the programmed cell death which occurs in germinal cells, is apoptosis or a different type of cell death not dependent on caspases. This is crucial, since other development models have shown that caspase activation is associated to differentiation and not to apoptosis.

Within this conceptual frame, the main objective of this thesis is to determine whether the *in vivo* inhibition of caspases affects cell death or the progression of spermatogenesis in rats. To reach this objective we will use general and specific inhibitors of caspase-8 y -9, caspases of which their participation in apoptosis in other systems has been shown. Results indicate that the inhibition of caspases prevents apoptosis in germinal cells which occurs during the rat's puberty (20 to 25 days of age). However, this inhibition does not affect the progression of spermatogenesis, as was observed in rats 42 days after the inhibitor treatment. Even better, these rats were fertile. Using these specific inhibitors we observed that only the general inhibitor and the one for caspase-8, but not the one for caspase-9, significantly inhibited apoptosis in germinal cells. This suggests that caspase-8 is involved in the main signalling pathway of apoptosis, which is activated by death receptors on the plasmatic membrane.

Concluding, this thesis therefore suggests that caspases induce germinal cell apoptosis. These results allow elucidating possible signals which induce physiologic apoptosis in germinal cells.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Espermatoogénesis

Los machos reproductivamente activos producen millones de espermatozoides, por ejemplo en el hombre este número asciende a más de 100 millones por día (Clemont, 1963). Esto ocurre en un proceso denominado espermatoogénesis, el cual es un mecanismo altamente ordenado que involucra múltiple divisiones y diferenciación celular, a partir de las cuales las células troncales germinales, llamadas espermatoogonias, pasan a formar espermatozoides maduros (Adashi E.Y. 1996). Este proceso ocurre físicamente al interior de los túbulos seminíferos de los testículos.

Los túbulos seminíferos son una red intrincada de pequeños túbulos y compartimientos que se convolucionan en vueltas o giros cuyos extremos están conectados a la *rete testis* (Russell, 1990). Además de las células germinales, los túbulos seminíferos contienen las células de Sertoli, las cuales se extienden desde la lámina basal hacia el lumen del túbulo y son las que sostienen a las células germinales, aportan los nutrientes y factores que permiten la proliferación y diferenciación (Figura 1A).

La espermatoogénesis se puede dividir funcionalmente en tres fases: la fase proliferativa, la fase meiótica y la fase de diferenciación o espermiogénesis. En la fase de proliferación las espermatoogonias se dividen mitóticamente tanto para

mantener el número de células troncales como para producir células que continuarán la diferenciación produciendo espermatocitos. Posteriormente continúa la fase meiótica, en la cual las células en meiosis (espermatocitos) recombinan el material genético para luego segregarlo dando lugar a las espermátidas haploides. Por último ocurre la espermiogénesis o fase de diferenciación, en la cual las células haploides o espermátidas redondas se diferencian para formar espermatozoides maduros, los cuales fertilizarán finalmente el óvulo (Adashi E.Y et al, 1996; Russell, Figura 1B).

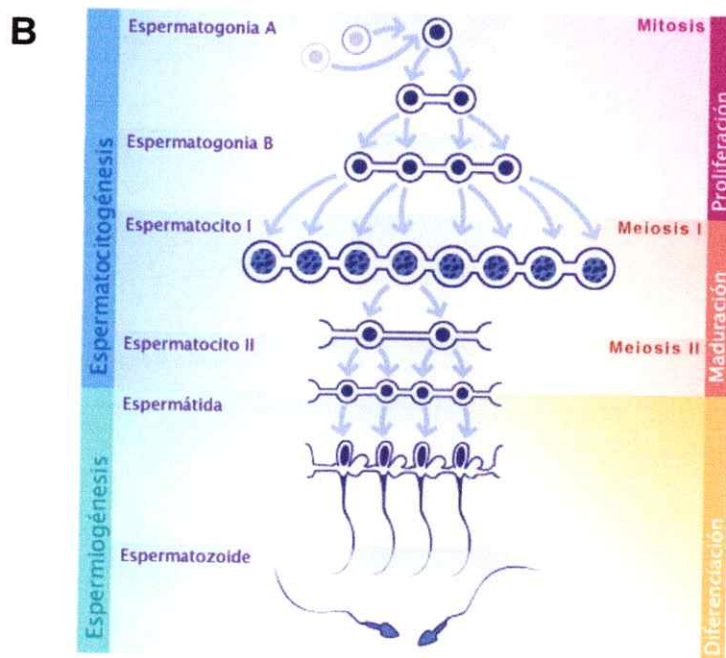
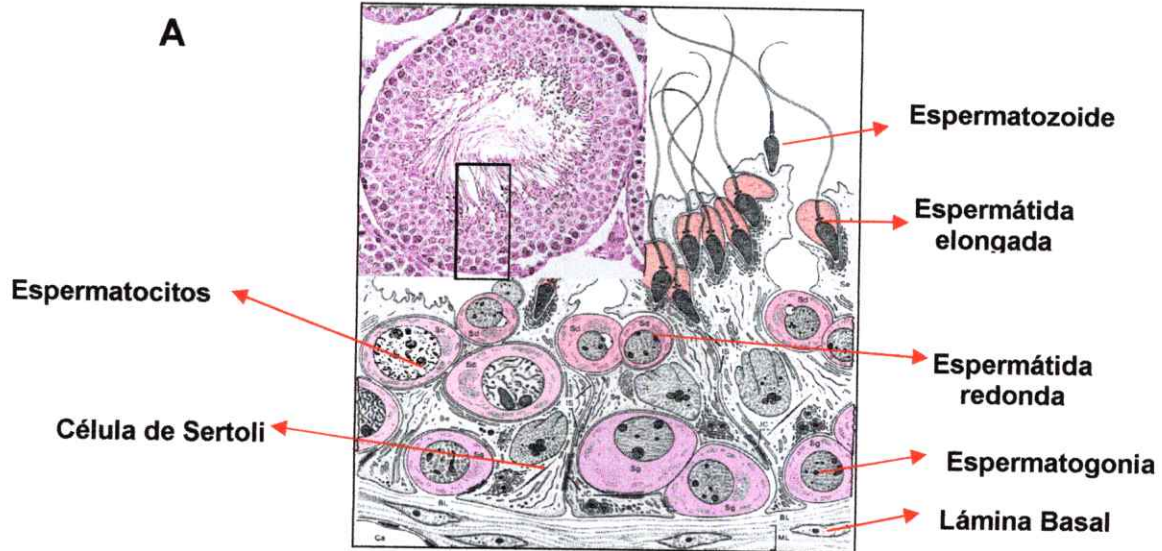


Figura 1: La Espermatogénesis.

A: Organización de las células germinales en los túbulos seminíferos en un testículo. La Figura representa un dibujo donde se aprecian los diferentes tipos de células germinales desde las espermatogonias (en la base del túbulo) hasta los espermatozoides maduros (hacia el lumen tubular). B: Diagrama de las etapas de la espermatogénesis. La imagen resume los eventos de división celular (fase proliferativa), diferenciación (fase meiótica) y diferenciación (espermiogénesis) que llevan a la formación de espermatozoides.



La espermiogénesis es la fase final de la diferenciación de la célula germinal, previo a la liberación del espermatozoide ya formado desde el epitelio seminífero. Durante la espermiogénesis, las células germinales haploides parcialmente diferenciadas, llamadas espermátidas redondas, sufren cambios enormemente complejos tanto morfológicos como bioquímicos y fisiológicos, que dan como resultado un espermatozoide altamente asimétrico y flagelado. Aunque el número de etapas de la espermatogénesis varía entre las especies, se pueden diferenciar por cambios morfológicos discretos, basados en modificaciones estructurales que ocurren en el acrosoma del espermatozoide en formación. Estas etapas pueden ser clasificadas en las fases: Golgi, capuchón, acrosoma y maduración (Hamilton DW, 1990).

Dentro de los testículos se pueden encontrar túbulos con varios tipos celulares (por ejemplo espermatogonias, espermátidas, espermátocitos). Dentro de un mismo túbulo, un tipo particular de célula germinal está sincronizado en el desarrollo con sus células vecinas. Es decir, todos los espermátocitos primarios aparecen en una capa concéntrica relativamente cerca de la base del túbulo y están desarrollados de manera similar. Así, si se encuentran túbulos dentro del corte de testículo con un tipo celular en la misma fase del desarrollo que otro túbulo observado, se deduce que las células germinales dentro de ese túbulo están en fase y son similares aparentemente a las del otro túbulo.

Dentro de este contexto, se define asociación celular o estadio a una agrupación de células germinales en una fase particular del desarrollo en los

cortes de testículos. Cada tipo celular de cada asociación celular está funcionalmente integrada con las otras en los procesos de desarrollo (Russell, 1990). En la mayoría de los mamíferos los estadios están conformados secuencialmente a lo largo del eje longitudinal del túbulo seminífero, de manera tal que los segmentos del túbulo contienen los diferentes estadios en orden secuencial. Este orden de los estadios y su repetición a lo largo de los túbulos constituye las ondas espermatogénicas en el epitelio seminífero. Así, el estadio I es seguido por el estadio II y este por el III hasta el estadio XIV (en la rata) el cual es seguido nuevamente por el estadio I (Figura 2) Las ondas son producidas por el desarrollo sincrónico de las unidades clonales de las células germinales (Clemont, 1972; Hess, 1999). En humanos, se han definido seis estadios en la espermatogénesis los que constituyen un ciclo espermatogénico, mientras que en la rata, como se mencionó anteriormente, se pueden encontrar catorce estadios. Dentro de los mamíferos esta última ha sido la especie más extensamente estudiada en relación a los aspectos de la espermatogénesis.

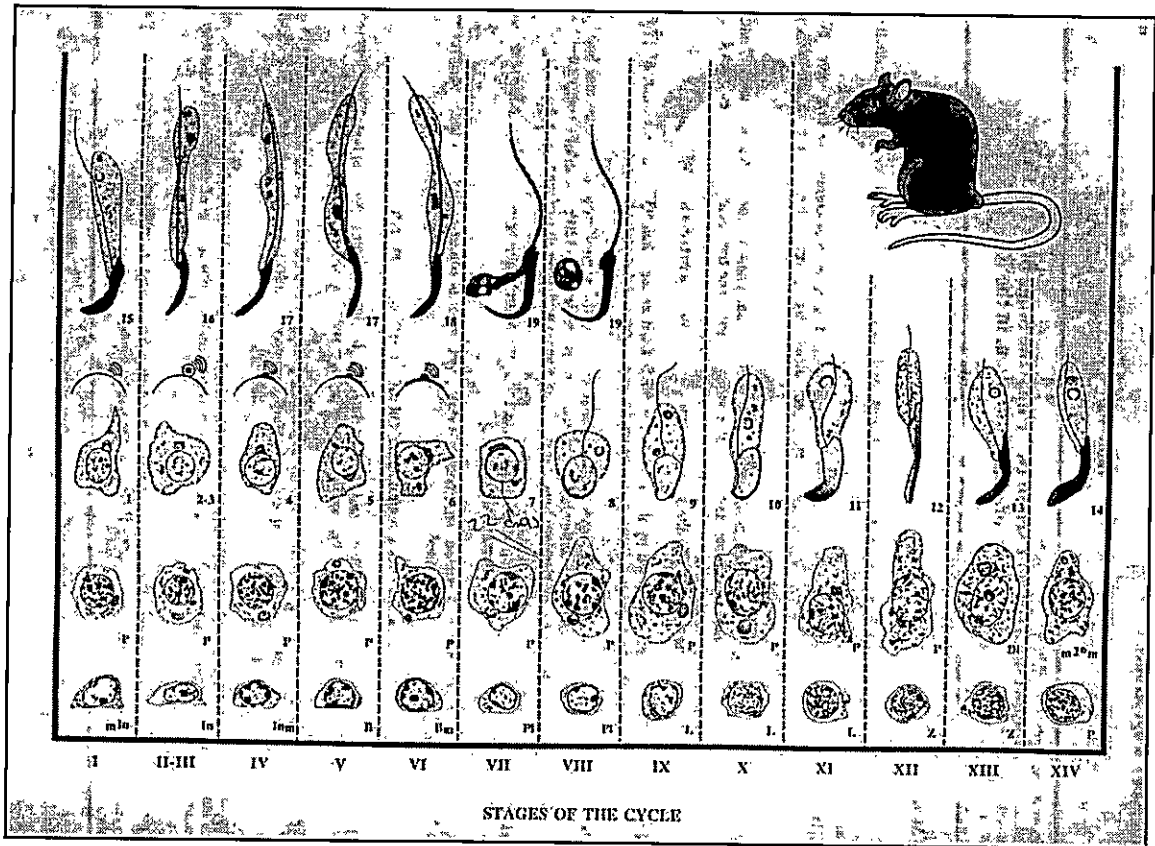


Figura 2: Representación de los estadios del ciclo del epitelio seminífero de la rata. Cada una de las catorce designadas con números romanos (I-XIV) representa una asociación de espermatogonias, espermátocitos y espermátidas los cuales definen un estadio del ciclo. (Russell, 1990).

La diferenciación de una población de células germinales comienza aproximadamente a los 10 días post coito (pc) en la rata. Posteriormente las espermatogonias comienzan a dividirse mitóticamente hasta el día 17 pc hasta pasar a una fase de arresto mitótico que se mantendrá hasta el nacimiento del animal. Alrededor de los 6 días de edad las células retoman nuevamente su actividad mitótica dando origen a las espermatogonias tipo A, las cuales son las células troncales de la espermatogénesis en los testículos adultos (McCarrey,

1993). A continuación comienza la primera onda de la espermatogénesis marcada por el inicio de la meiosis I sobre las espermatogonias para dar paso a espermatocitos primarios, proceso que se desarrolla desde los 9 a los 23-26 días de edad aproximadamente. En seguida los espermatocitos realizan la Meiosis II formando espermátidas haploides. Esto quiere decir que a los 25 días de edad podremos encontrar espermatogonias, espermatocitos y algunas pocas espermátidas redondas. Por otra parte si viéramos un corte de testículo a los 50 días de edad encontraríamos también numerosas espermátidas redondas, espermátidas alongadas y espermatozoides. Finalmente, comienza la espermiogénesis sobre las espermátidas redondas para su diferenciación a espermatozoides, proceso que abarca desde los 26 a los 45 de edad aproximadamente en la rata (McCarrey, 1993). Este proceso se repite una y otra vez a lo largo de toda la vida reproductora del macho.

## 1.2 Apoptosis

La muerte celular programada fisiológica es un componente esencial para el desarrollo animal y la homeostasis tisular (Pascal et al, 2000). El término "muerte celular programada" fue originalmente utilizado en 1964 para describir una serie de eventos que llevaban a una muerte celular durante el desarrollo (Lockshin y Williams, 1964) . Posteriormente, Kerr y sus colegas introdujeron el término "apoptosis" en 1972 para diferenciar una muerte celular con características morfológicas distintivas que ocurría tanto en el desarrollo como en la homeostasis de los organismos multicelulares (Kerr et al, 1972; Hikim y Swerdloff, 1999).

El proceso de la apoptosis da cuenta de una serie de cambios morfológicos y bioquímicos como la reducción del volumen celular, la aparición de protuberancias ("blebbing") en la membrana plasmática, condensación y fragmentación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Además, fosfatidilserina, un fosfolípido que normalmente se localiza en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, es translocado hacia la superficie externa, exponiéndose hacia el medio ambiente extracelular durante las etapas tardías de la apoptosis. Esta exposición conlleva a su posterior interacción con proteínas del sistema inmune como la anexina V, constituyendo uno de los principales blancos del reconocimiento por parte de los fagocitos (Hail et al, 2006). Sin embargo, la exposición de fosfatidilserina no siempre conlleva

apoptosis en todos los tipos celulares, ya que en el espermatozoide este evento es independiente de la muerte celular y se cree que juega un rol en la remodelación de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación (de Vries et al, 2003). En general, estos cambios en la membrana plasmática que permiten la unión de fagocitos consiguen evitar la liberación del contenido celular y por ende una posible reacción de inflamación, evento distintivo de la necrosis (Hail N et al, 2006).

Por otro lado, una de las características celulares más clásicas de la apoptosis es la condensación y fragmentación de la cromatina. Esto ocurre debido a la activación de endonucleasas dependientes de magnesio y calcio, las cuales cortan específicamente el DNA ubicado entre las unidades nucleosomales (espacios de aproximadamente 200 pares de bases) (Gerschenson y Rotello, 1992). Esta característica ha proporcionado adicionalmente un diagnóstico confiable para la detección de muerte celular a través de diferentes métodos. Los fragmentos de DNA pueden separarse a través de geles de agarosa dando lugar a un patrón de "escalera" (ladder) típicamente asociado a la apoptosis. Por el contrario, en la necrosis, el DNA es degradado al azar por endonucleasas citosólicas y lisosomales produciendo un patrón de "chorreo" también detectado mediante un gel de agarosa (Gerschenson y Rotello, 1992; Hail N et al, 2006). La fragmentación del DNA que ocurre durante la apoptosis se puede visualizar en cortes histológicos utilizando una técnica conocida como TUNEL (TdT-mediated dUTP nick-end

labelling). Este sistema mide la fragmentación del DNA de las células apoptóticas basándose en la adición catalítica de nucleótidos conjugados con fluoresceína a los extremos 3'OH libres del DNA a través de la enzima Terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT) (Gavrieli et al, 1992). Los nucleótidos fluorescentes pueden ser visualizados posteriormente de manera directa en un microscopio de fluorescencia o cuantificados por citometría de flujo (Krishnamurthy et al, 1998)

### 1.3 Vías de activación de caspasas

La apoptosis ocurre gracias a la función de una familia de proteínas, llamadas caspasas, las cuales son las principales ejecutoras de este proceso. Las caspasas, son cisteíno proteasas que cortan un polipéptido después de un residuo de aspartato en sus sustratos (Riedl Setefan J et al, 2004). Hoy en día se conocen 11 caspasas diferentes, las cuales se pueden clasificar en tres grupos: en el grupo I se encuentran las caspasas involucradas en los proceso de inflamación (caspasa-1, -4, -5, -13) mientras que tanto en el grupo II como en el III se encuentran las caspasas relacionadas directamente con la apoptosis. El grupo II ubica a las primeras caspasas en activarse tras recibir diferentes estímulos, son conocidas como caspasas iniciadoras (caspasa-6, -8, -9, -10), mientras que el grupo III reúne a aquellas caspasas que son activadas por las iniciadoras, razón por la cual se denominan caspasas efectoras o

ejecutoras (caspasa-3, -7) (Nicholson, 1999).

La apoptosis se puede inducir principalmente por dos vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Figura 3). La vía intrínseca o también llamada de la mitocondria responde a diferentes estímulos generados al interior de la célula, como por ejemplo daño en el DNA (Hengartner, 2000). Uno de los eventos iniciales característicos de esta vía es la disrupción del potencial de membrana mitocondrial, el cual es considerado un "punto de no retorno" en la muerte celular (Van Loo et al, 2002). Este evento induce la formación de un poro de transición de permeabilidad, formando un canal que comunica el citosol de la mitocondria con el citoplasma celular. Se propone que a través de este canal se liberan diferentes componentes mitocondriales tales como el citocromo c, la endonucleasa G, los factores inductores apoptóticos (AIFs), Omi/HTRA2 y Smac (second mitochondrial-derived activator of caspases) /Diablo (direct inhibitor of Apoptosis (IAP)- binding protein with low pI), que llevaran a la activación de la cascada apoptótica (Van Loo et al, 2002). El Citocromo c en el citoplasma se une a la proteína APAF1, lo cual induce un cambio conformacional en ésta, permitiéndole unir ATP y junto con la procaspasa-9 formar un complejo multiproteico llamado apoptosoma, el cual media la activación de la procaspasa-9 a caspasa-9. (Wu et al, 2000; Garrido et al, 2006).

Por otra parte, la familia de proteínas BCL-2 (B-cell lymphoma 2) regulan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Esta familia puede



dividirse en tres grupos de acuerdo a sus dominios de homología con BCL-2 (dominios BH) y a sus funciones. Los miembros de la familia antiapoptótica BCL-2 se caracterizan por tener cuatro dominios BH. En este grupo se encuentran, entre otras, las proteínas BCL-X<sub>L</sub>, MCL-1 y BCL-2; los miembros de la familia proapoptótica de multidominios (como BAX, BAK o BOK) en cambio poseen tres dominios BH (Garrido et al, 2006). Por último, están los miembros de la familia proapoptótica *BH3-only* que incluyen a BAD, BID y BIM, las cuales comparten homología solo en el dominio BH3. Todas estas proteínas son capaces de formar homo o heterocomplejos a través de sus dominios BH con los cual afectan de una u otra manera la formación del poro de permeabilidad de la mitocondria, regulando de esta manera la apoptosis (Garrido et al, 2006).

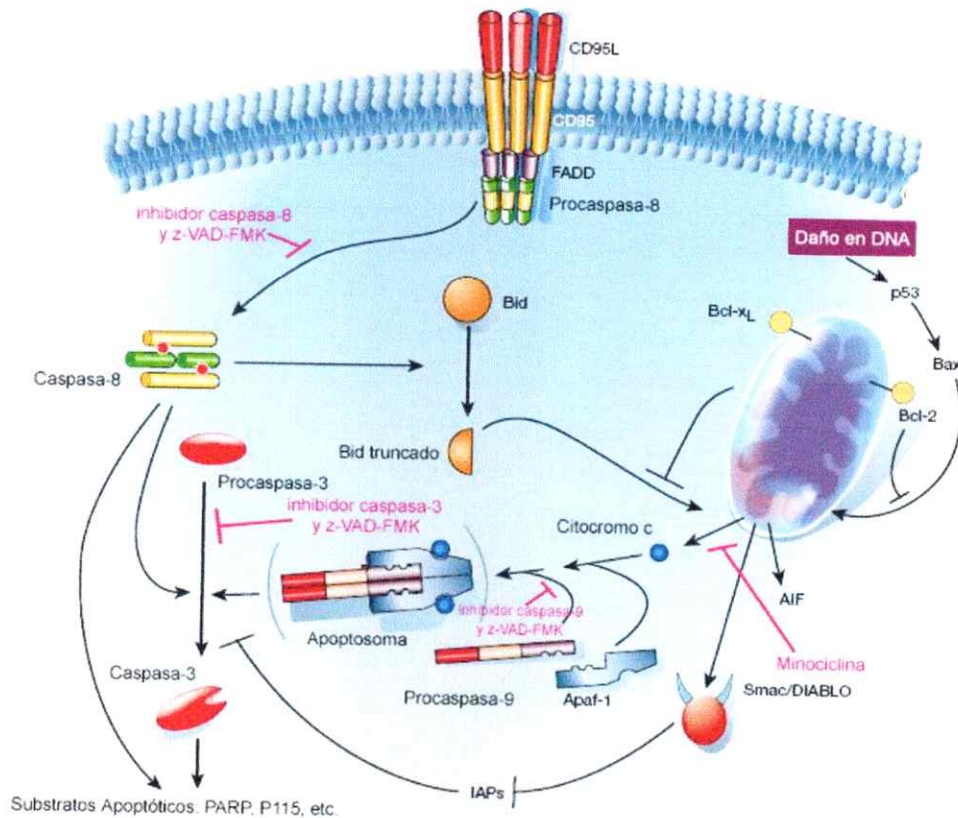


Figura 3: Principales vías de activación y regulación de la apoptosis.

El diagrama muestra la activación caspasas ya sea por la vía extrínseca a través de receptores de membrana o por la vía intrínseca gracias a la liberación del citocromo c. Además se observan en rosado algunos de los inhibidores sintéticos utilizados en el presente estudio. (Imagen modificada de Hengartner, 2000, Nature)

La vía extrínseca o de receptores de membrana es iniciada por la unión de un ligando de muerte, como por ejemplo Fas-L o TRAIL, a un receptor específico, como Fas o DR5 respectivamente (Ozoren et al, 2003; Bhardwaj et al, 2003). Dicha unión lleva a la formación de un complejo en la cara interna de la membrana plasmática que posteriormente recluta factores citosólicos como FADD (Fas-associated proteins with death domain) formando un complejo señalizador inductor de muerte llamado DISC (death-inducing signalling

complex). La formación del DISC genera la activación de las caspasas iniciadoras 8 y 10 (Riedl Stefan J et al, 2004).

Cabe destacar que ambas vías (extrínseca e intrínseca) están comunicadas a través de la proteína BID, que pertenece a la familia BCL-2 (Li et al, 1998; Luo et al, 1998). Tras la transducción de señales proapoptóticas extracelulares a través de los receptores de membrana, BID es activado proteolíticamente por la caspasa-8. Posteriormente el fragmento C-terminal de BID, t-BID o BID truncado, es translocado a la mitocondria y promueve la liberación de citocromo c (Garrido et al, 2006).

Finalmente, la activación de las caspasas iniciadoras (caspasa-8, -9 y -10) por una u otra vía convergen en la proteólisis y activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7, las cuales participan en el clivaje de diferentes sustratos que causan la muerte de la célula, no solo por la contribución en el aumento del daño celular sino también, en algunos casos, participando activamente en el proceso del daño a la célula (Riedl, 2004)

Se han identificado aproximadamente 280 sustratos de caspasas, los cuales pueden ser divididos de acuerdo a sus características funcionales e incluyen proteínas de andamiaje tanto del citoplasma como del núcleo, proteínas transductoras de señales y proteínas reguladoras de la transcripción (Fisher et al, 2003). Dentro de éstas se encuentra la Poli (ADP-Ribosa)polimerasa-1 (PARP-1), la cual cataliza la transferencia de los polímeros de ADP-Ribosa a proteínas nucleares facilitando la reparación del DNA (Herceg et al, 2001).

PARP-1 es clivada en su sitio DEVD lo que genera la inactivación de su actividad catalítica disminuyendo la capacidad celular de poder reparar el daño en el DNA y posiblemente previniendo la depleción del ATP, el cual es necesario para el proceso apoptótico (Fisher et al, 2003). Sin embargo, ratones PARP (-/-) no muestran un fenotipo que indique un rol fundamental de esta proteína en el proceso apoptótico o sensibilidad a apoptosis mediada por FAS o TNF (otro ligando proapoptótico) (Wang et al, 1997). Estos resultados sugieren que el clivaje de PARP es un evento característico, pero presumiblemente dispensable para la mayoría de las vías apoptóticas. (Fisher et al, 2003).

Otra proteína clivada por caspasas durante la apoptosis es P115, la cual está localizada en el Aparato de Golgi donde cumple un rol fundamental en la mantención de la arquitectura de dicho organelo (Puthenveedu MA et al, 2001). P115 es clivada por la caspasa-3 en cuatro fragmentos de 90, 75, 50 y 30 kDa, y por la caspasa-8 generando sólo los fragmentos de 90 y 30 kDa. El fragmento C-terminal de P115 generado tras el clivaje es capaz de inducir la fragmentación del Aparato de Golgi y en consecuencia generar apoptosis (Chiu et al, 2002).

## 1.4 Regulación de la actividad de las caspasas

### 1.4.1 Control de la activación de las caspasas

La estructura de las caspasas esta altamente conservada a través de las especies. Su base es un monómero con dos subunidades catalíticas, una grande de aproximadamente 20 kDa (p20) y una pequeña de aproximadamente 10 kDa (p10) (Figura 4). A pesar de que las caspasas son sintetizadas como zimógenos de una sola cadena, sus formas activa como inactivas están estructuradas por homodímeros de los heterodímeros p20:p10 o (p20:p10)<sub>2</sub>.

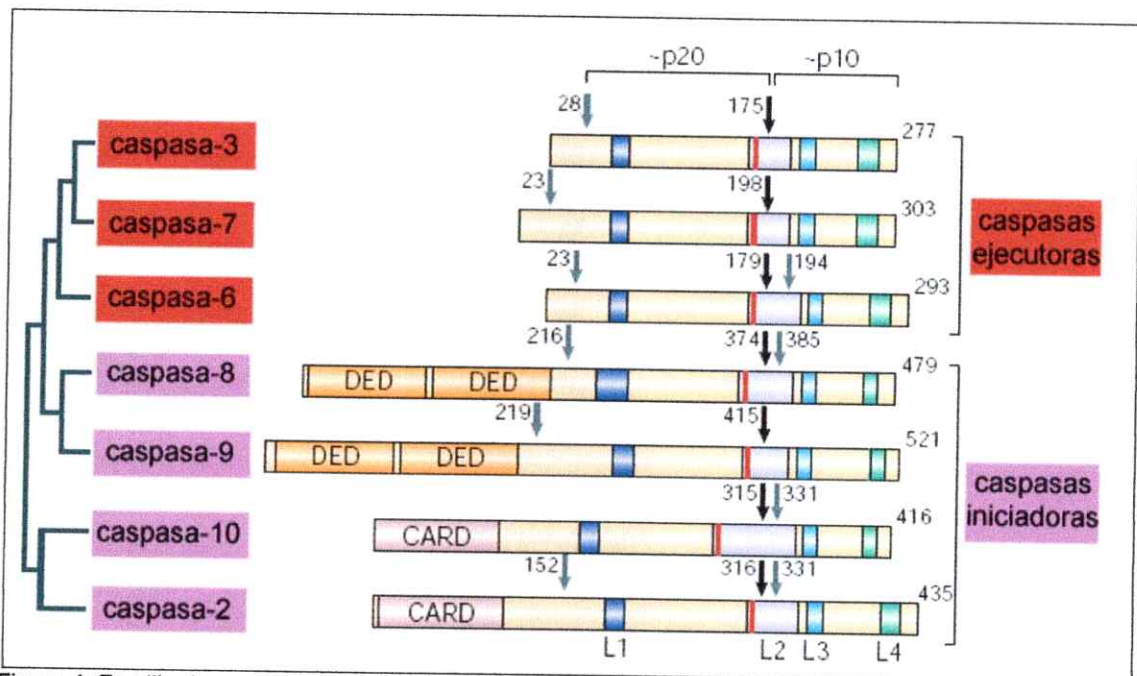


Figura 4: Familia de caspasas apoptóticas de mamífero.

Se muestran modelos de las estructuras de las caspasas ejecutoras (en rojo) e iniciadoras (en púrpura) en donde se aprecian los primeros sitios de clivaje que sufren los zimógenos (flecha negra) y los posibles posteriores (flecha gris). (Imagen modificada de Riedl Stefan, 2004, Nature Reviews, Molecular Cell Biology).

En un comienzo la información que se tenía acerca de la estructura de las caspasas se conoció gracias a estudios de cristalografía de la caspasa-7 con inhibidores sintéticos (Chai et al, 2001). Es así como se pudo apreciar la alta conservación de su sitio activo, los cuales están en los loops L1-L4 (loops activos). Durante la activación el loop L2 es clivado permitiendo el cambio conformacional que lleva a la exposición de la cisteína catalítica. (Riedl Stefan, 2004). Las subunidades catalíticas p20 y p10 están separadas por un corto dominio de unión o "link": es éste el que tras la activación y la remoción del prodominio es clivado y liberado generando las isoformas activas de estas proteínas (Sohn et al, 2005). La conversión a las formas activas requiere, generalmente, de clivajes secuenciales, primero para separar p20 de p10 y luego un segundo clivaje sobre p20 (Liu et al, 2005).

Las caspasas efectoras se caracterizan estructuralmente por tener un prodominio pequeño (caspasa-3 -6 y-7) y cortar diversos sustratos celulares mientras que las caspasas iniciadoras (caspasas-8-9-10) contienen prodominios más largos (Figura 4) que utilizan en el reclutamiento de proteínas, formando complejos de alto peso molecular como el apoptosoma de la vía intrínseca o el complejo DISC de la vía extrínseca (Sohn et al, 2005).

La procaspasa-3 experimenta varios cortes posibles para la generación de las formas activas. Su isoforma zimógena pesa alrededor de 30 kDa y la generación de su actividad catalítica comienza con la formación de los intermediarios de 21 y 19 kDa, los cuales posteriormente dan paso a la isoforma

completamente activa de 17 kDa. La procaspasa-8, por otro lado, pesa aproximadamente 53 kDa y sus intermediarios activos van desde 40 kDa hasta las formas pequeñas de 20 kDa y 16 kDa. Finalmente, la procaspasa-9 pesa aproximadamente 45 kDa y presenta sus contrapartes activas 37, 35 y hasta 10 kDa (Earnshaw et al, 1999).

#### 1.4.2 Inhibidores farmacológicos de caspasas

La inhibición de la apoptosis a través de diferentes fármacos o drogas ha sido uno de los principales focos de estudio para la prevención de enfermedades degenerativas, como por ejemplo Parkinson o Alzheimer. Así se encontró, por ejemplo que la taurina inhibe la apoptosis inducida por isquemia en cardiomiocitos, previniendo la formación del apoptosoma (Takatani et al, 2004). A su vez minociclina suprime la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol, y por ende inhibe la vía intrínseca (Matsuki et al, 2003; Vera, 2005). Existen en la actualidad numerosos péptidos capaces de inhibir, tanto de manera selectiva como general, a las diferentes caspasas dependiendo del rango de los aminoácidos que los constituyan, ya sea desde un residuo aspartato (Boc-Asp-FMK) hasta trímeros (z-VAD-FMK) y tetrámeros (Ac-DEVD-CHO). Los péptidos actúan como pseudo sustratos de las caspasas activas, inhibiéndolas de manera competitiva (Callus y Vaux, 2006). El péptido z-VAD-

FMK es un inhibidor general de caspasas constituido por tres de los 4 aminoácidos de la secuencia blanco de los sustratos lo que le permite ser reconocido por diferentes caspasas (caspasa-1, -3, -5, -7, -8 y -9) (García-Calvo et al, 1998). Dado que posee una fluorometilcetona como grupo funcional, su inhibición es irreversible. Dicho grupo lo hace mucho más permeable a las células en comparación con los inhibidores con grupos aldehídos (Callus y Vaux, 2006; Ekert et al, 1999).

Aunque la efectividad de los inhibidores farmacológicos ha sido comprobada en numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, la especificidad en ambos casos puede variar. Si bien la constante de inhibición ( $K_i$ ) es un fuerte indicio de que el inhibidor es capaz de bloquear caspasas específicamente a concentraciones fisiológicas, no es una indicación de los posibles efectos sobre otras enzimas o sobre otras proteínas no consideradas como blancos. Además, los inhibidores tienen un amplio rango de especificidad y potencia contra la actividad de las caspasas con  $K_i$  que van en el rango desde pM hasta  $\mu$ M (Tabla 1).



Tabla 1: Ejemplos de inhibidores específicos de caspasas.

Inhibidor de Caspasa	Tipo de Inhibidor	Caspasas Blanco	Fuerza de la inhibición
p35	Proteína del Baculovirus	Amplio espectro: caspasas: -1, -3, -6, -7, -8 y -10	$K_i$ s 0,1 – 9 nM
EVD-CHO	Péptido sintético permeable reversible	Potente inhibidor de caspasa-3 y -7.	$K_i$ < 2nM
z-VAD-FMK	Péptido sintético permeable no reversible	Inhibe a todas las caspasas, pero inhibe muy débilmente a la caspasa-2	$K_i$ s 2,5 – 2400 nM
Q-VD-Oph	Péptido sintético	caspasa-1-3-8 y -9	IC50 25-400 nM

Se muestran la fuerzas de inhibición, expresado ya sea en  $K_i$  como en IC50

Se muestran la fuerzas de inhibición, expresado ya sea en  $K_i$  como en IC50

La utilización de inhibidores in-vivo ha conseguido exitosos avances en el estudio de enfermedades asociadas a disfunciones apoptóticas. Por ejemplo z-VAD-FMK logró prevenir la muerte neuronal en el hipocampo y reducir la respuesta inflamatoria cerebral en el modelo de meningitis (Braun JS et al, 1999)

## 1.5 Roles no apoptóticos de caspasas

A pesar de que la mayoría de los estudios vinculan las caspasas con eventos de apoptosis, se han identificado otros tipos de funciones para esta familia de proteínas en distintos tipos celulares. Así, se han implicado en el procesamiento de citoquinas durante la inflamación (Thornberry et al, 1992) y en la proliferación de los linfocitos T (Kennedy et al, 1999). En células PC12 se observó que la activación de caspasa-3 es un requisito necesario para una adecuada morfología y dispersión celular sugiriendo como uno de sus blancos, dentro del contexto no-apoptótico, a la proteína citoesquelética tau (Rohn et al, 2004).

En *Drosophila melanogaster* la caspasa efectora DRICE, homóloga a la caspasa-3 de mamíferos, es clivada y activada en espermátidas elongadas, y la expresión específica en el testículo de la mosca del inhibidor apoptótico del baculovirus, p35, conlleva a la infertilidad, a pesar de que la apoptosis no es un paso obligado en la espermatogénesis en dicho individuo (Arama, et al 2003). Más aun, Huh demostró en 2004 que la actividad de la caspasa DRICE era requerida para la individualización de las espermátidas, lo cual sugiere un rol importante para las caspasas durante el normal desarrollo del proceso espermátogénico en esta especie (Huh et al, 2004). Sin embargo no se sabe nada acerca del posible papel que puedan estar jugando las caspasas en la espermatogénesis en mamíferos. Solo existe un trabajo en que se muestra que

algunas proteínas que participan en el proceso de apoptosis tales como p53, p21 se expresan localmente en el cuerpo residual de espermátidas en elongación y podrían estar involucradas en la espermiación.

## 1.6 Apoptosis durante la Espermatogénesis

Cálculos teóricos sugieren que un 75% del total de células que se generan en las primeras etapas de la espermatogénesis mueren por apoptosis (Huckins, et al 1978), afectando principalmente espermatogonias y espermátocitos. En la rata adulta, la apoptosis en los testículos ocurre principalmente en los estadios XII-XIV y I durante la espermatogénesis. Ratones transgénicos que sobreexpresan las proteínas antiapoptóticas BCL-2 o BCL-X<sub>L</sub>, a pesar de ser viables y con un desarrollo normal son infértiles, presentando diferentes anomalías que van desde túbulos seminíferos más delgados y con menos células germinales hasta túbulos sólo con células de Sertoli y depletados completamente de células germinales (Yan et al, 2003). Resultado similar se observa al producir animales knock out para la proteína Bax (Knudson et al, 1995), en los cuales se comprobó la necesidad de una apoptosis regulada por Bax en espermatogonias para que pudiera ocurrir el desarrollo testicular y la espermatogénesis (Russell et al, 2002). Estos estudios sugieren fuertemente la necesidad de una regulación y desarrollo normal de la apoptosis para la adecuada fertilidad del individuo. Una de las hipótesis que podría explicar la

necesidad de esta onda apoptótica es la mantención de un número adecuado de células espermatogénicas versus células de Sertoli (balance célula germinal/Sertoli), es decir las células de Sertoli sólo serían capaces de sostener adecuadamente a un número determinado de células germinales, aquellas que no puedan recibir la adecuada mantención son las predestinadas a la muerte celular por apoptosis.

La apoptosis en el testículo puede ser inducida por variados factores, tales como stress por temperatura, alteraciones en las dosis de testosterona intratesticular, exposición de células de Sertoli a variados tóxicos ambientales, etc. En todos estos casos, la alteración de la espermatogénesis conlleva generalmente a la infertilidad y ha sido sujeto de numerosos estudios (Sinham Hikim et al, 2003). Sin embargo, los mecanismos que llevan a la apoptosis fisiológica durante la espermatogénesis son desconocidos. En células espermatogénicas se ha encontrado una expresión diferencial del receptor de muerte Fas (Lizama C et al, 2006). Además sus ligandos respectivos Fas-L y SCF pueden ser encontrados también de manera diferencial en células de Sertoli. Más aún, se encontró que los 25 días de edad en la rata no sólo presentan la mayor cantidad de células TUNEL (+) sino también la mayor expresión de Fas y que ésta afecta principalmente a espermatoцитos (Moreno et al, 2006; Lizama et al, 2006). Recientemente, se demostró que las proteínas c-IAP1 y c-IAP2 son altamente expresadas en testículos adultos y que su inhibición aumenta la sensibilidad de las células germinales a la apoptosis

mediada por Fas (Wang et al, 2006). Estos datos tomados en conjunto, reafirman la participación de receptores de membrana en apoptosis testicular sugiriendo una potencial activación de la vía extrínseca en la apoptosis de las células germinales. Pero siendo las caspasas las principales efectoras de la apoptosis, es interesante preguntarse cuál es el rol que juegan en este modelo ¿Qué vías de activación están implicadas en el desencadenamiento de la apoptosis? Además si consideramos que la espermatogénesis es un evento principalmente de diferenciación celular, ¿Podrían las caspasas estar involucradas en eventos no apoptóticos relacionados con diferenciación? Dentro de este contexto, esta tesis pretende analizar los efectos de la inhibición de caspasas *in vivo* durante la espermatogénesis de la rata.

## 2. HIPÓTESIS

La ejecución de la muerte celular ocurrida durante la espermatogénesis en la pubertad de las ratas se debe a la activación de las caspasas.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivos Generales

Determinar si la inhibición de las caspasas previene la muerte celular o afecta la progresión de la espermatogénesis.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar si la inhibición farmacológica de las caspasas previene la muerte celular programada fisiológica de células germinales masculinas *in vivo*.
- Analizar el efecto de la inhibición farmacológica de las caspasas sobre la progresión de espermatogénesis de la rata.
- Estudiar el efecto de la inhibición farmacológica de las caspasas en la fertilidad de las ratas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico y procedimientos quirúrgicos

Se utilizaron ratas Sprage Dawley de 18, 20, 21, 22, 23, 24 y 62 días de edad, las cuales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los animales fueron mantenidos con dieta de agua y comida ad libitum y con ciclos día/noche de 12 horas. Al momento de la obtención de las muestras las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical. Para los tratamientos quirúrgicos se anestesiaron con una mezcla de Ketamina:Xilaxina 3:1 (1 mL/ 100 mg de peso del animal), posteriormente se inyectaron intratesticularmente con los tratamientos respectivos para cada experimento. Para la inhibición general de caspasas se utilizó el inhibidor z-VAD-FMK y FITC-VAD-FMK, para la inhibición específica de caspasa-8 el inhibidor Ac-IEDP-CHO, para la caspasa-9 se utilizó minociclina y z-LEHD-FMK. En todos los casos los inhibidores fueron disueltos en DMSO hasta una concentración de 1  $\mu$ M. Además se inyectaron animales con E64d 100  $\mu$ M, con el vehículo DMSO a modo de control (vehículo). En cada ocasión, se inyectaron intratesticularmente aproximadamente 10  $\mu$ l de la solución con el inhibidor o con el vehículo. En algunos casos se utilizaron además animales sin inyectar (control).

### 4.2 Reactivos

Cloruro de potasio (KCl), Dodecil sulfato de Sodio (SDS),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , TRIS, EDTA, Glicina, Cloruro de Sodio (NaCl), Urea, colagenasa, Albúmina de suero de bovino (BSA), Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), Fluoruro de sodio (NaF), Agarosa, Azida de sodio, PIPES, Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), Rojo Ponceau, Fucsina, Azul de Coomassie G-250, azul de bromofenol, Persulfato de Amonio (APS), Dimetilsulfóxido (DMSO), ditiotreitól (DTT), Penicilina G, HEPES, CHAPS, Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), D-glucosa, Sucrosa, Acrilamida, Metabisulfito de Sodio, Glicerol, Minociclina, Tween-20, TritonX-100, NP-40, Cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), Bicarbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ), Polilisina y el anticuerpo hecho en conejo anti-Tubulina fueron obtenidos de la compañía Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ), 2-propanol, Entellan, metanol y ácido acético glacial fueron obtenidos de la compañía MERCK (Darmstadt, Germany). Cloroformo, TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina), acetona, xilol, alcohol etílico y formalina fueron obtenidos de Winkler S.A. Ácido ortofosfórico fue obtenido de Sudelab. Anticuerpos hechos en conejo anti-caspasa 3 y fue obtenido en la compañía Cell Signaling (Danvers, MA, USA), mientras que los anticuerpos desarrollados en conejo anti-IAP1 y anti-PARP (contra las dos isoformas PARP-1 y PARP-2) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) respectivamente. E64d (inhibidor cisteíno proteasas) Leupeptina hemisulfato, AEBSF (Fluoruro de p-aminoetilbencenosulfonilo) inhibidor serino proteasas, aproptinina (inhibidor tripsina pancreática), inhibidor de caspasa 8 (Ac-IEPD-CHO), inhibidor de caspasa-9 (z-LEHD-FMK) y



sustratos para caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9 fueron obtenidos de la compañía Merck (Whitehouse Station, NJ, USA). Fosfato de bromoclorindolil (BCIP), Nitrobluetetrazolium (NBT), Kit de TUNEL verde e inhibidor general de caspasas (z-VAD-FMK) fueron obtenidos de Promega (Madison, WI, USA). Anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina y medio de montaje Vecta Shield para fluorescencia se obtuvieron de Laboratorios Vector (Burlingame, CA, USA). El sistema de revelado para peroxidasa se obtuvo de la firma Lab Vision (Fremont, CA, USA). Anticuerpos desarrollados en ratón anti-SCP3 y anti-P115 se obtuvieron de la compañías Abcam (Cambridge, UK) y de Laboratorios Transduction (San José, CA, USA) respectivamente. Hematoxilina y Eosina se obtuvo de la firma Chemicon (Temecula, CA, USA). Las membranas de nitrocelulosa se obtuvieron de Advantec MFS. El anticuerpo hecho en ratón anti-acrosina fue un regalo del Dr. Claudio Barros (Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, PUC)

Tabla 2: Lista de Anticuerpos utilizados en el estudio.

Anticuerpo	Concentración Stock	Dilución Western Blot	Dilución Inmuno	Compañía
Acrosina (C <sub>5</sub> F <sub>11</sub> )	---	---	1:100	---
Caspasa-3	20 µg/ mL	1:1000	---	Cell Signaling
SCP3	0,80 mg/mL	---	1:100	Abcam
P115	250 µg/ mL	1:1000	---	Transduction Laboratories
Caspasa-8	20 µg/ mL	1:1000	---	US Biological
PARP		1:1000	---	Santa Cruz
Tubulina	50µg/mL	---	1:100	Sigma- Aldrich
CK2 β	200µg/mL	1:500	---	Santa Cruz

#### 4.3 Obtención de testículos y extractos proteicos

Luego del sacrificio de las ratas, los testículos fueron removidos y decapsulados (desprendimiento de túnica albugínea) en buffer fosfato salino (PBS 1X: 0,58M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,17M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,68M NaCl, pH 7,4). Inmediatamente fueron homogeneizados mecánicamente en hielo con buffer de homogeneizado RIPA (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, NP-40 1%, Deoxilato de sodio 0,25%) más inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, EDTA 1mM, Leupeptina 1µg/ml, Aproptinina 1µg/ml, Pepstatina 1µg/ml) a 4 °C. Posteriormente se procedió a

centrifugar a 10.000 rpm (9279 g) durante 10 minutos a 4 °C en una microcentrífuga marca Eppendorf modelo 5415D (Hamburg, Germany). El pellet fue descartado y el sobrenadante con el extracto proteico se utilizó tanto para los ensayos de actividad enzimática como para las electroforesis de proteínas.

#### 4.4 Fijación e inclusión de testículos

Para los diferentes análisis histológicos los testículos se fijaron tanto en Paraformaldehido al 4% en PBS 1X o en BOUIN (ácido pícrico 75% v/v, formalina 25% v/v y ácido acético glacial 5% v/v) (Bancroft et al, 1994), preparado previo a la extracción. Al día siguiente fueron cortados transversalmente para su posterior inclusión en parafina. Posteriormente fueron deshidratados en una batería de etanoles de concentración creciente (50, 70, 80, 90 y 100% v/v) por 30 min cada vez, seguido de una nueva deshidratación con etanol 100% y 2 lavados en Xilol por 1 hora cada vez. A continuación los testículos fueron incluidos en parafina.

#### 4.5 Cortes en parafina

Los bloques de parafina fueron cortados en un micrótopo rotatorio Leica 1212 (Leitz Wetslar, Germany) para producir cortes de 10 µm de espesor, los cuales

se pusieron sobre portaobjetos previamente xilanizados y recubiertos de polilisina. Se dejaron secar durante 30 min a 37 °C.

#### 4.6 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick end-labeling (TUNEL).

Los cortes de testículos fueron desparafinados con xilol y rehidratados en una batería de alcoholes de 100, 96, 90, 80, 70, 50 % v/v por 5 min cada uno. Luego, fueron sumergidos en NaCl 0,85% p/v. y lavados en PBS 1X pH=7,4 por 5 mín. Enseguida fueron fijados en paraformaldehído 4% durante 15 mín. y tratados con una solución de proteinasa K 0,02 mg/ml. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X por 5 min y fueron puestos en tampón de equilibrio (Buffer TE (Tris 1M pH 8, EDTA 0,5M pH 8); 5X buffer Transferasa Terminal, 25 mM CoCl<sub>2</sub>) Después de la incubación, se agregó el buffer de incubación (Buffer de Equilibrio, mix de nucleótidos y enzima TdT) y fueron cubiertos con un cubreobjeto plástico para asegurar una buena distribución del buffer. En seguida fueron mantenidos en cámara húmeda a 37°C por una hora en la oscuridad. Luego la reacción se detuvo con el tampón de detención SSC (3M NaCl, 0.3 M citrato de sodio) y las muestras fueron montadas con vectashield y analizadas en un microscopio de epifluorescencia Optiphot-2 (Nikon, Japón), y se tomaron fotos con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 (Nikon, Japón). El

Índice apoptótico fue definido como el número de células TUNEL (+) cada 100 túbulos seminíferos.

#### 4.7 Inmunihistoquímica

Para el desenmascaramiento del antígeno, los cortes desparafinados y rehidratados fueron inmersos en Tampón de Citrato de Sodio 0,01M (pH 6,0) y llevados a la ebullición, manteniéndose durante 10 min a la temperatura de sub-ebullición. A continuación se enfriaron en el mismo tampón a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, se agregó sobre los cortes una solución de peróxido de hidrógeno 3% v/v durante 10 min para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Luego, los cortes fueron bloqueados con PBS-BSA 1% durante 1 h seguidos de la incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C: anti-SCP3, anti-Tubulina o anti-acrosina (ver Tabla 2). Según el anticuerpo primario, los cortes fueron incubados con anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y contrateñidas con hematoxilina durante 10 min. Finalmente, fueron montadas con Entellan y analizadas en un microscopio.

#### 4.8 Identificación de glúcidos y tinción con hematoxilina-eosina

Para la identificación de glúcidos se realizó la Reacción del ácido Peryódico-Schiff (PAS) (McManus, 1946). Los cortes de testículos se desparafinaron y trataron con una solución de ácido periódico al 1% p/v por 10 min, posteriormente se colocaron en el Reactivo de Schiff durante 30 min en oscuridad. Luego de 4 lavados en agua sulfurosa seguida de agua corriente, se procedió a realizar contratación con hematoxilina por 5 segundos aproximadamente. Finalmente se lavaron y aclararon en xilol. Todas las fotografías tomadas a cortes de testículos se realizaron con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 (Nikon, Japón) en aumentos indicados en las figuras respectivas. Alternativamente, cortes desparafinados fueron mantenidos con hematoxilina durante 10 min y posteriormente tratados con eosina durante 1min. Posteriormente fueron llevados hasta xilol para ser montados con Entellan.

#### 4.9 Western Blots

La cantidad de proteína de los extractos proteicos se determinó por el método de Bradford (Bradford MM, 1976). Se cargaron 100 µg de proteína en cada carril en geles de poliacrilamida de diferentes porcentajes (10%, 12 y 20%), en condiciones denaturantes y reductoras (SDS-SAGE) (Laemmli, 1970). Las

muestras se sometieron a 100 V durante 2 h y luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 350 mA durante 1 h 30 min. Las membranas fueron bloqueadas con PBS-BSA 2% por 1 h y posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-caspasa 3, anti-PARP o anti-P115 a 4°C durante toda la noche (ver Tabla 2). Al día siguiente fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween al 0,1% por 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario respectivo conjugado a fosfatasa alcalina (1:5000) por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron incubadas con solución de revelado con BCIP (Fosfato de Bromoindolil), NBT (Nitrobluetetrazoilum) y MgCl<sub>2</sub> en Tris-NaCl 100 mM (pH 9,5).

#### 4.10 Actividad de caspasas

54 µl de extracto proteico fueron mezclados en una placa de ELISA junto con 10 µl de DTT 100 mM, 2 µl de DMSO (50 mM), 32 µl de Tampón para la actividad de caspasas (312,5 mM Hepes, 31,25 %p/v Sucrosa, 0,3125% CHAPS), y 2 µl de del substrato de caspasa-3, caspasa-8 o caspasa-9 según correspondiese. Posteriormente se realizaron mediciones cada 2 horas a 405 nm a temperatura ambiente. A partir de la curva cinética y junto con la cantidad de proteínas medidas por Bradford se calculó la Actividad enzimática de cada una de las caspasas que se define como 1 µg de producto formado por minuto.

#### 4.11 Análisis morfométricos

Se analizaron 100 túbulos seminíferos por cada corte con el programa Imagen Tool 3.0 para medir diámetro, área y altura del epitelio de los túbulos de tres ratas diferentes. Las muestras correspondían teñidos con hematoxilina-eosina de testículos adultos (62 días) de ratas inyectadas a los 21 días con z-VAD-FMK.

#### 4.12 Análisis de los datos

Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  error estándar. En cada experimento se utilizaron al menos 3 ratas para cada tratamiento. Para los análisis estadísticos se utilizaron las pruebas de ANOVA con el programa Prisma tomando como valor P significativo los menores a 0,05.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cinética de activación de caspasas 3, 8 y 9 en ratas prepúberes.

Datos preliminares de nuestro laboratorio muestran un gran aumento en el número de células TUNEL (+) medidas en los túbulos seminíferos de testículos entre los días 20 y 25 de la rata (Moreno et al, 2006). Sin embargo, esta técnica detecta la fragmentación del DNA, un evento posterior a la activación de caspasas en la cascada apoptótica. Cabe destacar que esta onda apoptótica es un evento que se continuará repitiendo a lo largo del desarrollo y en el adulto de manera cíclica y constante al igual que las ondas espermatogénicas. Sin embargo, el hecho de analizar animales durante la pubertad facilita la interpretación de los resultados, ya que a estas edades el modelo de desarrollo cuenta con los tipos celulares más importantes (espermatogonias, espermatocitos) lo que facilita la histología de los túbulos y sigue siendo un evento representativo de las ondas apoptóticas del adulto.

Dado que el principal objetivo del presente estudio radica en determinar si la inhibición farmacológica de las caspasas previene la muerte celular programada de células germinales, se procedió primero a medir la actividad de las caspasas iniciadoras más relevantes (caspasa-8 y -9) y la caspasa-3, entre los 20 y 25 días de edad. El objetivo de este experimento es poder determinar el día en que

la actividad de las caspasas comienza a aumentar y en ese instante realizar la inhibición farmacológica.

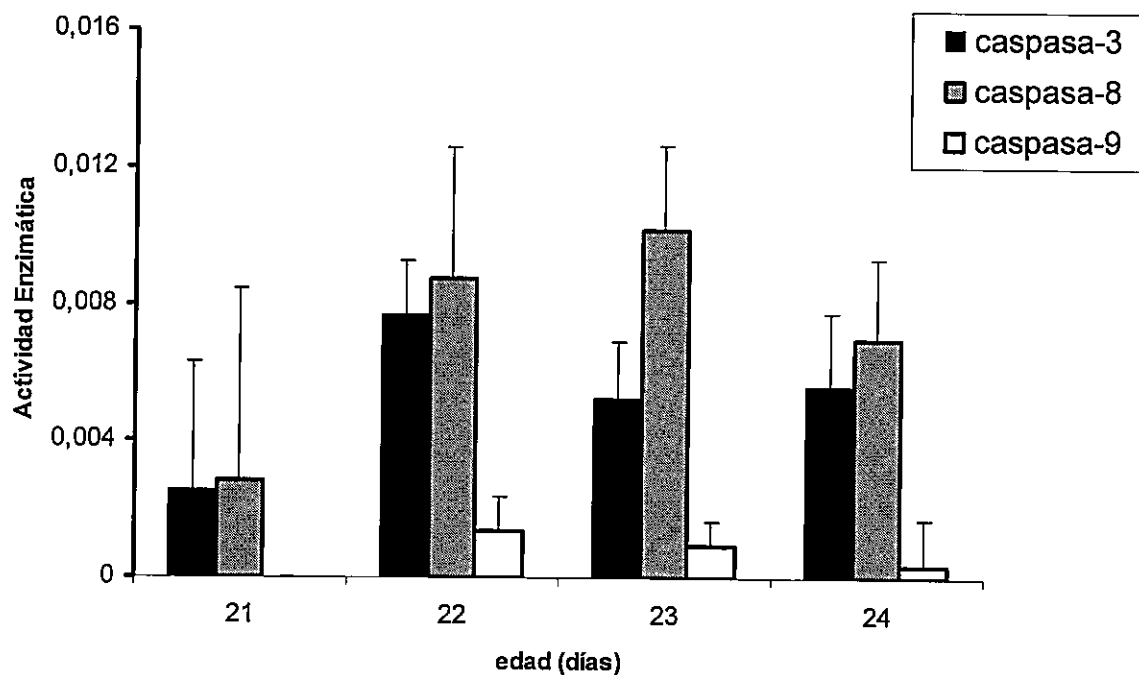


Figura 5: Cinética de activación de caspasas-3, -8 y-9 (c3, c8, c9 respectivamente) en testículos de ratas prepúberes de 21 a 24 días de edad. Se observa una tendencia a encontrar mayores niveles de actividad enzimática a los 22 días de edad de la rata.

En la figura 5 muestra que a los 22 días de edad hay una tendencia a encontrar los mayores niveles de actividad enzimática de las tres caspasas medidas. La caspasa-8 presentó una actividad mucho mayor que la obtenida con la caspasa-9 en todos los días estudiados. De hecho, la actividad de la caspasa-9 no se detectó en ratas de 21 días y sólo aumentó levemente a los 22 días de edad. Posteriormente sus valores se mantuvieron muy bajos a lo largo de todos los días analizados. Por otra parte, la actividad de la caspasa-3 mostró un aumento en el día 22, manteniéndose relativamente constante en los días posteriores.

## 5.2 Evaluación *in vivo* de la apoptosis con un inhibidor fluorescente.

Nuestro protocolo experimental de inhibición farmacológica se basa en la inyección intratesticular de inhibidores específicos y permeables a la célula. Uno de los principales supuestos en este procedimiento es que la distribución del inhibidor es homogénea a lo largo y ancho del testículo. Para evaluar la validez de este supuesto, decidimos utilizar un inhibidor general de caspasas (pan-inhibidor), que tiene la propiedad de que al ser procesado por las caspasas flúorese (z-VAD-FITC). De esta manera, las células fluorescentes verdes son células en apoptosis con caspasas activas.

Dado que la actividad máxima de las caspasas aumentó a los 22 días, se procedió a inyectar intratesticularmente 10  $\mu$ l del inhibidor general de caspasas

z-VAD conjugado a fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) en ratas de 21 días de edad. Se observa en el collage de imágenes que conforman la figura 6, la presencia de células positivas para la marca de FITC, en diferentes extremos de los túbulos en el testículo, lo que indica la distribución homogénea de z-VAD-FITC en todo el testículo. Por lo tanto, la inyección intratesticular es un método efectivo en que el compuesto se distribuye por todo el testículo. Además, se pudo ver una gran cantidad de marca lo que sugiere una alta actividad de diferentes caspasas, coincidentemente con las mediciones realizadas en 1.1. Adicionalmente, se inyectaron testículos con 10  $\mu$ l de azul de tripan, para observar la distribución de esa cantidad de volumen en el testículo y también se observó la llegada del colorante a las diferentes regiones del testículo, confirmando los resultados anteriores (Figura 6, recuadro).

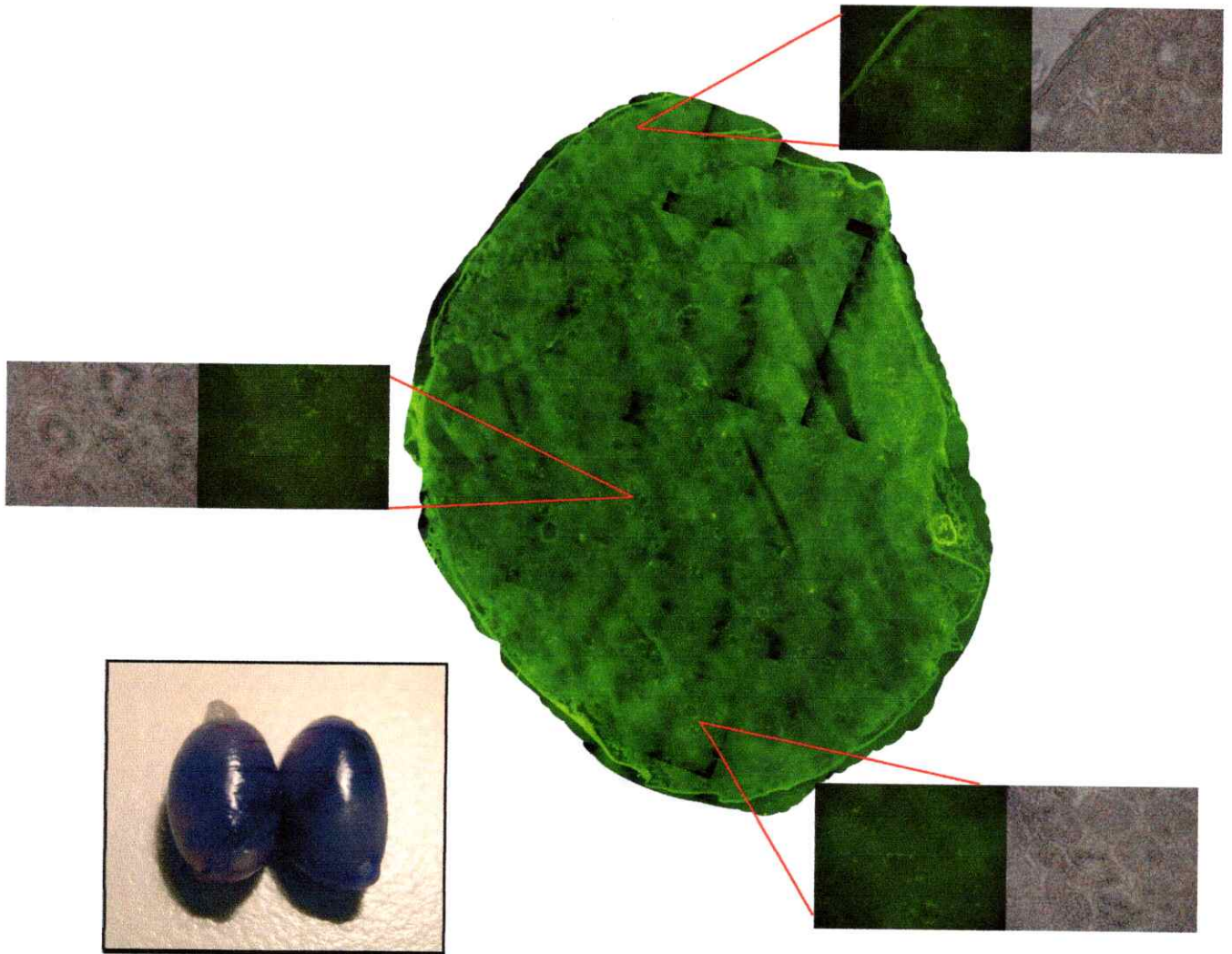


Figura 6: Distribución del inhibidor z-VAD-FITC en túbulos seminíferos de testículos de ratas de 22 días. La imagen muestra un collage de fotografías de túbulos seminíferos que conforman un testículo. Se observa un gran número de células positivas (verde) en los diferentes extremos del testículo. En el recuadro se muestran testículos, también de 22 días, inyectados con Azul de Tripan en donde también se ve el alcance del reactivo a las diferentes regiones del testículo.

### 5.3 Inhibición farmacológica de caspasas a los 22 días de edad.

#### 5.3.1 Efecto del inhibidor general de caspasas z-VAD-FMK.

En primer lugar se procedió a utilizar el inhibidor permeable de amplio espectro de caspasas z-VAD-FMK (ver Tabla 1) en testículos de ratas de 21 días para la posterior evaluación de actividad enzimática a los 22 días.

La figura 7A muestra que z-VAD-fmk 1  $\mu\text{m}$  logró inhibir significativamente la actividad enzimática tanto de la caspasa-8 como a la caspasa-9, pero no logró este efecto sobre la caspasa-3, en comparación con el vehículo ( $p < 0,05$ )

En los testículos inyectados con el vehículo la procaspasa-8 se encontró principalmente en sus formas proteolisadas (activas) de aproximadamente 43 y 20kDa (Figura 7B). Esta activación fue parcialmente prevenida con el inhibidor, en donde se observó principalmente la banda correspondiente al zimógeno de 55 kDa y la forma procesada de 43 kDa, no detectándose la forma de 20 kDa. Además, analizamos la proteólisis de dos sustratos endógenos de caspasa-3 (PARP y P115) como una medida alternativa a la actividad enzimática. Las proteínas PARP y P115 también mostraron una disminución de la proteólisis con el fármaco. Los efectos sobre PARP mostraron la proteólisis de la forma activa de 116 kDa exclusivamente en la forma de 25 kDa (Figura 7B).

En presencia del pan-inhibidor no se detectó la presencia del fragmento de 30

kDa, que es uno de los productos del procesamiento de P115 por caspasas, pese que, en comparación con el vehículo, no se observó una diferencia notoria en la forma no procesada de la proteína (Figura 7B). En la Figura también se muestra la subunidad  $\beta$  de la caseín kinasa 2 ( $ck2\beta$ ), la cual fue utilizada como control de carga.

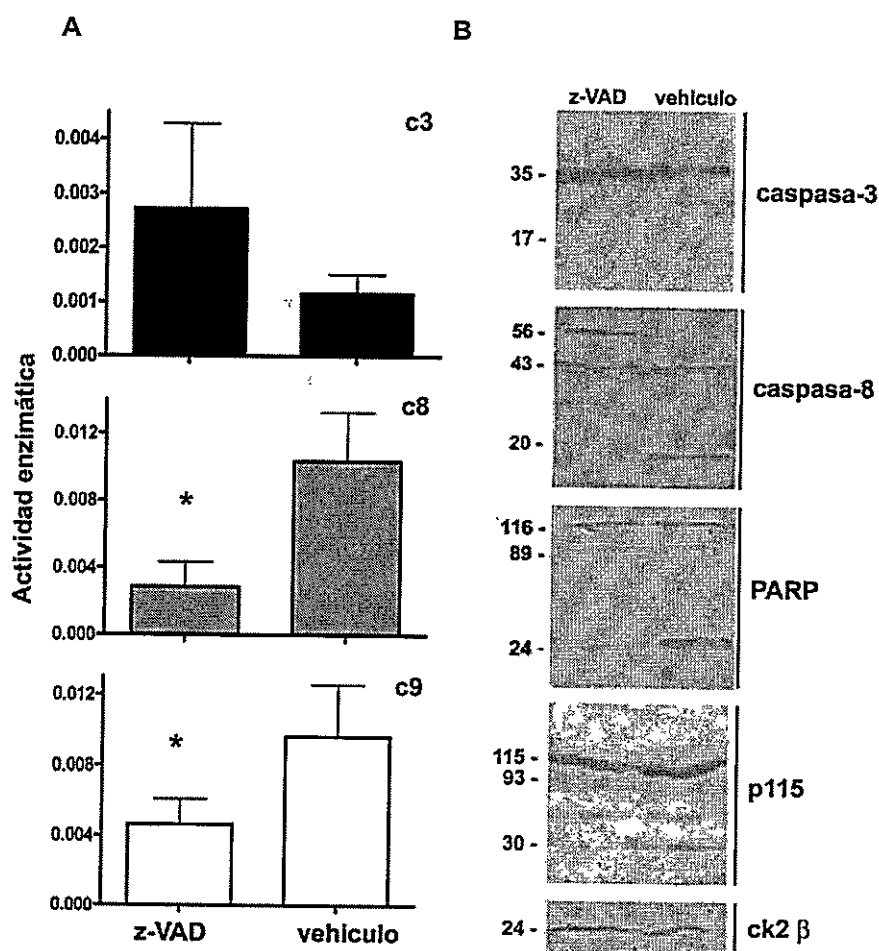


Figura 7: Actividad enzimática de caspasa-3, -8 y -9 en testículos de ratas tras inyección intratesticular de z-VAD-FMK.

A) Se muestran las actividades enzimáticas de las caspasa-3 (c3), caspasa-8 (c8) y caspasa-9 (c9) en los testículos tratados con z-VAD o con el vehículo. B) Western Blot representativo de la caspasa-3 (c3), caspasa-8 (c8), PARP y P115 en testículos de rata tratados con el inhibidor z-VAD o con el vehículo. La proteína quinasa 2 $\beta$  ( $ck2\beta$ ) se muestra como control de carga. (\*  $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 Efectos del inhibidor de caspasa-8

La inyección intratesticular del inhibidor sintético de caspasa-8 (Ac-IEPD-CHO) no redujo la actividad enzimática de la caspasa-3 en forma significativa, pese a que logró inhibir la actividad de la caspasa-8 y -9 (Figura 8A). Consecuentemente, se observó una disminución de la proteólisis de la procaspasa-8 en presencia del inhibidor, principalmente denotada a través de la ausencia de la forma activa de 20 kDa (Figura 8B). Sin embargo, la presencia del fragmento de 43 kDa no pareció resultar alterada. Por otro lado, la inhibición de caspasa-8 tampoco fue capaz de alterar el procesamiento de la caspasa-3. PARP no sufrió proteólisis hacia las isoformas de 89 y 24 kDa como ocurrió en los testículos inyectados con el vehículo, mientras que P115 no mostró mayores diferencias, presentando en ambos casos (con o sin el tratamiento) la forma de 30 kDa (Figura 8B).



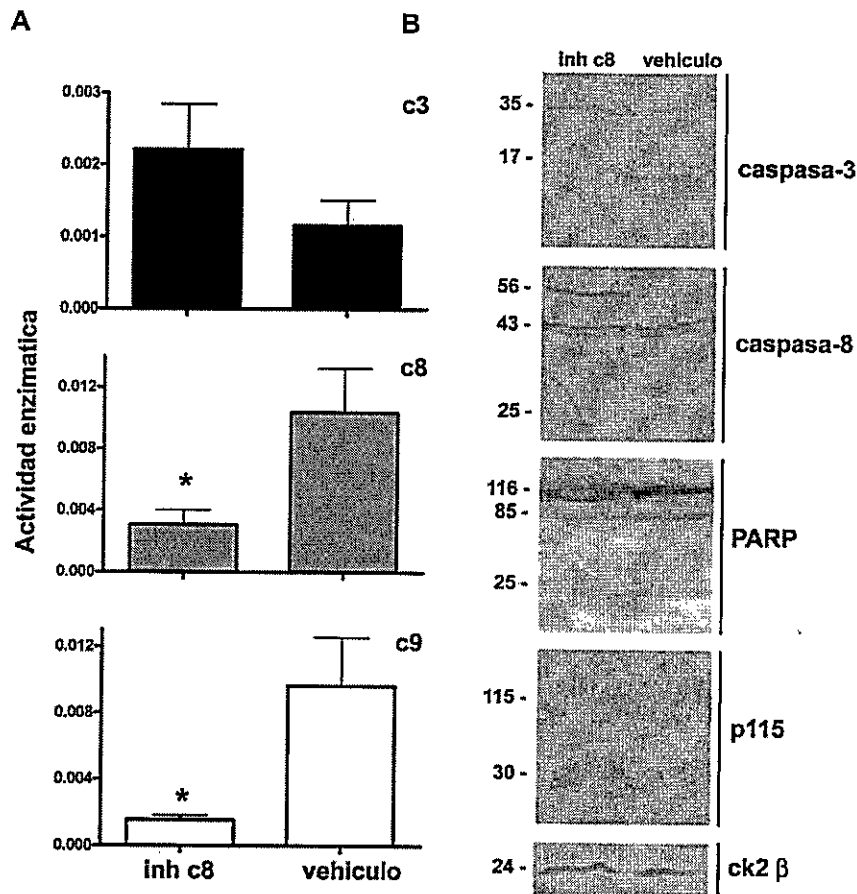


Figura 8: Actividad enzimática de caspasas-3, -8 y-9 en testículos de ratas de 22 días tras la inyección de inhibidor de caspasa-8 (Ac-IEPD-CHO). A) Se muestran las actividades enzimáticas de las caspasa-3 (c3), caspasa-8 (c8) y caspasa-9 (c9) en los testículos tratados con Ac-IEPD-CHO o con el vehículo. B) Western Blot representativo de la caspasa-3 (c3), caspasa-8 (c8), PARP y P115 en testículos de rata tratados con el inhibidor Ac-IEPD-CHO o con el vehículo. La proteína quinasa 2β (ck2β) se muestra como control de carga. El inhibidor disminuye la proteólisis de caspasa-8 y PARP. Este tratamiento inhibe las actividades enzimáticas de las caspasa-8 y -9 (\*  $p < 0,05$ ).

### 5.3.3 Efectos de la inhibición específica de caspasa-9.

Posteriormente, se quiso evaluar los efectos de la inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis. Para esto se utilizó el inhibidor sintético de caspasa-9 (z-LEHD.FMK) o el antibiótico minociclina, el cual se ha descrito que impide la liberación del citocromo c desde la mitocondria inhibiendo de esta manera la formación del apoptosoma, lo cual genera la inhibición de la cascada generada por la caspasa-9 (Matsuki et al, 2003).

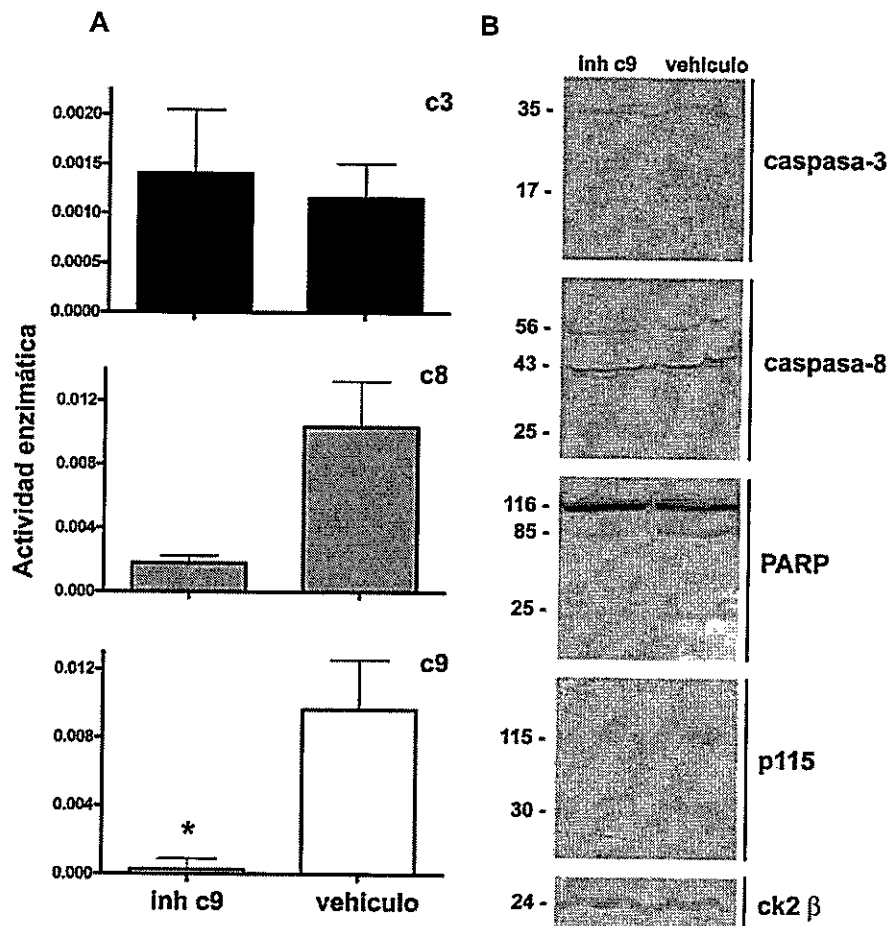


Figura 9: Actividad enzimática de caspasas-3, -8 y-9 en testículos de ratas de 22 días tras la inyección del inhibidor específico de caspasa-9. A) Se muestran las actividades enzimáticas de las caspasa-3 (c3), caspasa-8 (c8) y caspasa-9 (c9) en los testículos tratados con inhibidor de caspasa-9 o con el vehículo. B) Western Blot representativo de la caspasa-3 (c3), caspasa-8 (c8), PARP y P115 en testículos de rata tratados con el inhibidor de caspasa-9 o con el vehículo. La proteína quinasa 2β (ck2β) se muestra como control de carga. Se observó una inhibición significativa de ambas caspasas iniciadoras, caspasa-9 y caspasa-8 (\* p< 0,05).

La inyección con minociclina o con z-LEHD-FMK disminuyó los niveles de actividad de la caspasa-8 y de la -9, pero no afectó a la caspasa-3 (Figura 9A). Por otro lado, la inhibición de caspasa-9 no causó efectos diferentes al vehículo en el procesamiento de la caspasa-9 la cual se puede apreciar tanto en su

forma zimógena o activa de 56 kDa como en las formas procesadas de 43 y 25 kDa. El corte de la caspasa-3 por otro lado, se inhibió parcialmente con el tratamiento. Los sustratos apoptóticos PARP y P115 no mostraron diferencias considerables entre las muestras tratadas y las controles. En ambos casos se observaron las formas procesadas de las proteínas: para PARP las formas de 85 y 25 kDa y el fragmento de 30 kDa en el caso de P115 (Figura 9B).

#### 5.3.4 Efectos del inhibidor E64d sobre la actividad de las caspasas.

E64d es un inhibidor irreversible de cisteíno-proteasas, por lo cual es interesante estudiar el efecto sobre la actividad de las caspasas. E64d causó una inhibición total de todas las caspasas estudiadas (caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9) (Figura 10A). Sin embargo este resultado no se refleja en las proteólisis, ni de las caspasas-3 y -8 ni de los sustratos PARP y P115, los cuales no mostraron diferencias significativas con el vehículo.

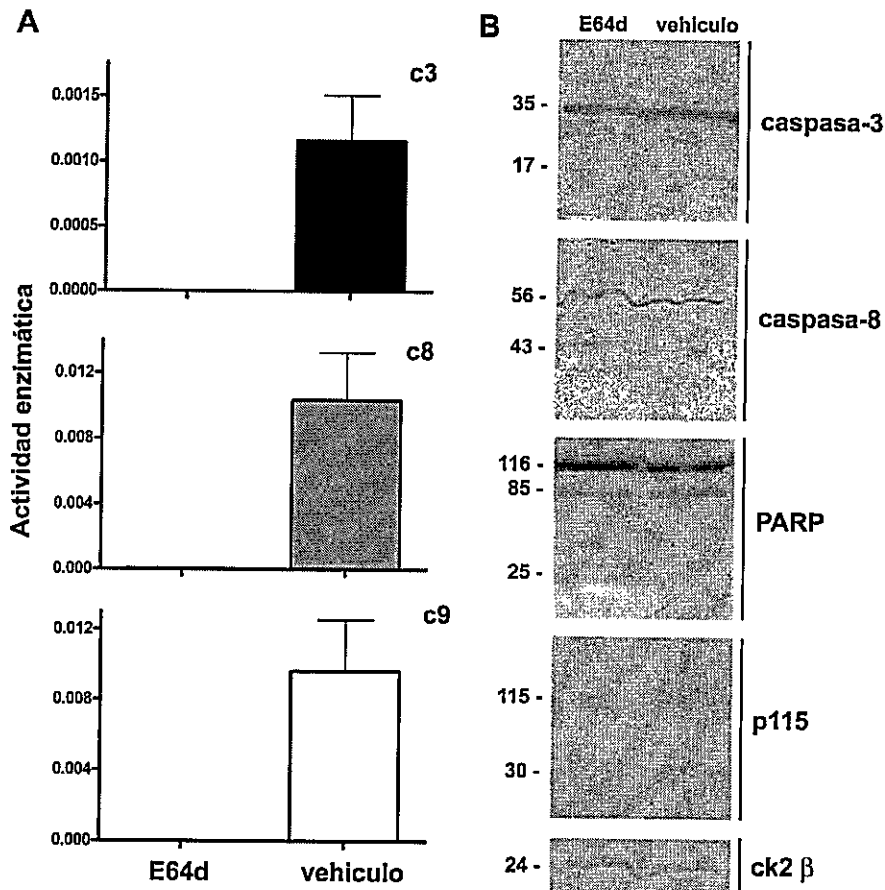


Figura 10: Actividad enzimática de caspasas-3, -8 y -9 en testículos de ratas de 22 días tras la inyección de E64d.

A) Se muestran las actividades enzimáticas de las caspasa-3 (c3), caspasa-8 (c8) y caspasa-9 (c9) en los testículos tratados con E64d o con el vehículo. B) Western Blot representativo de la caspasa-3 (c3), caspasa-8 (c8), PARP y P115 en testículos de rata tratados con E64d o con el vehículo. La proteína quinasa 2β (ck2β) se muestra como control de carga. En ambos casos se observó una disminución casi total de la actividad de las tres caspasas medidas. (\*  $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Efectos de la inhibición de caspasas sobre la fragmentación del DNA.

Cortes de testículos inyectados con diferentes tratamientos fueron sometidos a la prueba de TUNEL para poder observar la fragmentación del DNA, quizás el evento más característico de la apoptosis (Figura 11A).

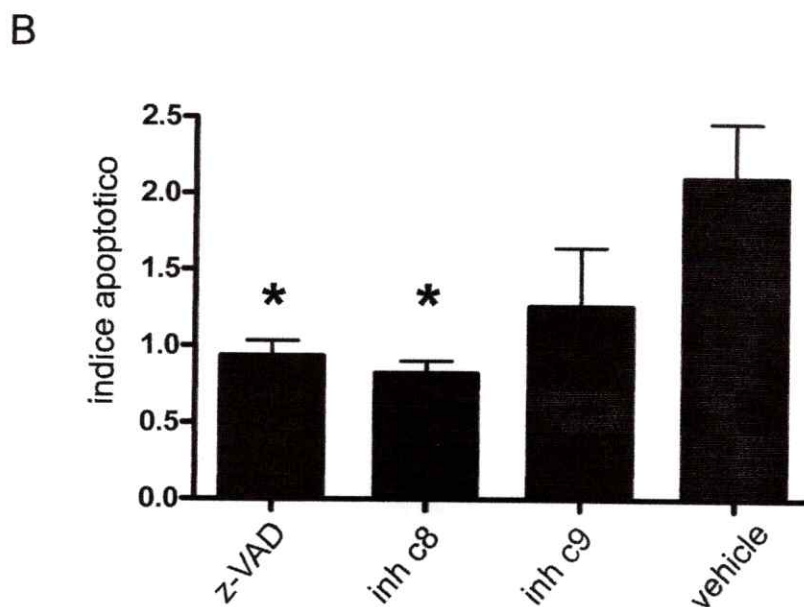
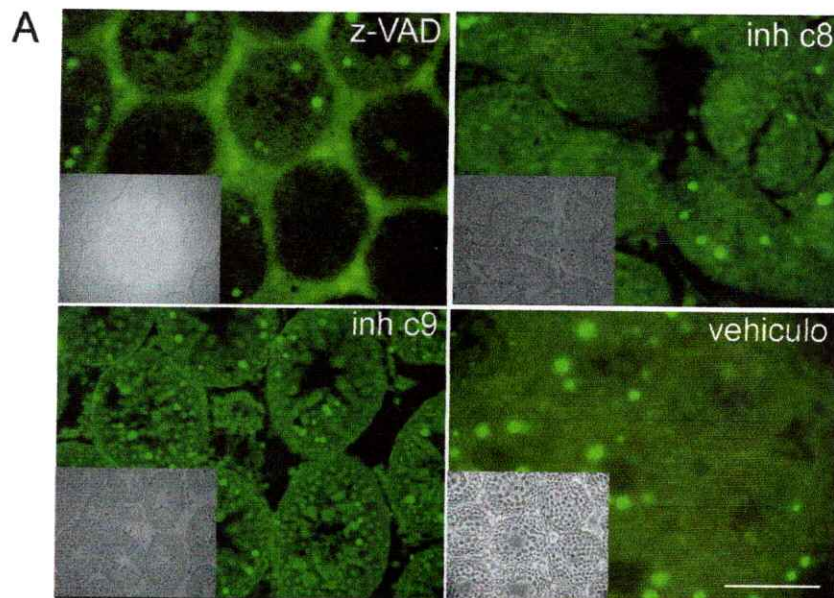


Figura 11: Células germinales TUNEL (+) en testículos de ratas de 22 días inyectadas con diferentes tratamientos.

Se observa que el inhibidor de caspasa-8 (Ac-IEPD-CHO) y el inhibidor general (z-VAD-FMK) lograron disminuir el número de células TUNEL (+) con respecto al vehículo y control respectivamente (B), no así la inhibición de caspasa-9 . ( $p < 0,05$ ). Escala de las barra 50  $\mu$ m).

Los testículos inyectados con el inhibidor z-VAD-FMK mostraron muy pocas células TUNEL (+), lo que se vio reflejado en una disminución significativa del índice apoptótico (Figura 11,  $p < 0,05$ ). Un resultado similar ocurrió con el inhibidor de caspasa-8, el que redujo significativamente el número de células en

apoptosis (Figura 11,  $p < 0,05$ ) con respecto a los testículos inyectados con el vehículo. Sin embargo, no se observó una reducción de células TUNEL (+) en los testículos inyectados con minociclina.

## 5.5 Efecto de la inhibición general de caspasas sobre la diferenciación de los túbulos seminíferos.

El siguiente objetivo de esta tesis fue examinar los efectos causados por la inhibición temprana de las caspasas sobre el normal desarrollo de la espermatogénesis. Para esto, se utilizó el inhibidor general de caspasas z-VAD-FMK, el cual fue inyectado en ratas de 21 días (ver Materiales y Métodos) y luego se esperaron 41 días para analizar los resultados. Es decir, estas ratas fueron tomadas y sacrificadas para análisis a la edad adulta de 61 días. Se siguió este protocolo experimental debido a que a los 21 días de edad el tipo celular más avanzado que se encuentra en la rata son los espermatoцитos. En tanto a los 61 días de edad la primera onda de espermatogénesis se ha completado y pueden observarse espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos. De esta manera pensamos que sería más fácil determinar cualquier alteración en la espermatogénesis.

### 5.5.1 Efectos de inhibición de caspasas sobre la organización general de los túbulos.

Como primera aproximación quisimos evaluar la histología general del testículo mediante la tinción de hematoxilina-eosina. La figura 12 muestra que no hubo

diferencias cualitativas en la organización de los testículos inyectados en comparación con los controles sin tratamiento o los controles inyectados con el vehículo

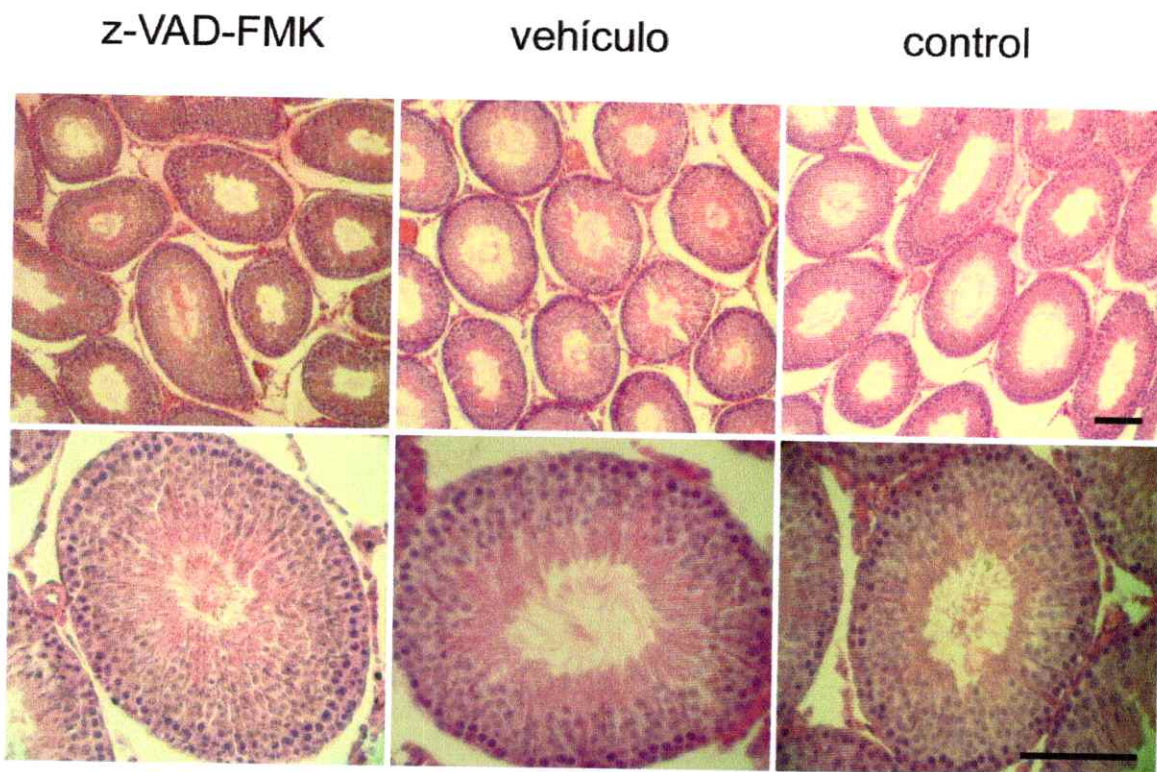


Figura 12: Organización celular en los túbulos seminíferos. z-VAD-FMK no causó efectos sobre la organización ni desarrollo de los túbulos seminíferos. Los cortes teñidos con hematoxilina-eosina no mostraron diferencias importantes entre los testículos tratados con el inhibidor en comparación con los controles. (Barra superior e inferior: 100  $\mu$ m y 50  $\mu$ m respectivamente).

Además, se realizó un análisis morfométrico de varios parámetros estructurales de los túbulos seminíferos tales como área y diámetro de los túbulos y altura del epitelio con el fin de evaluar de manera cualitativa medidas indirectas de la cantidad de células por túbulo o de posibles diferencias en el desarrollo de éstos a partir de los cortes histológicos. La altura del epitelio seminífero se



utilizó como una medida de la cantidad de células que contienen estas estructuras. El diámetro y el área de los túbulos seminíferos se pueden considerar una evaluación de la cantidad de células germinales, pero también de la función de la célula de Sertoli. Los resultados indican que no hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados entre los testículos inyectados con el inhibidor, los controles o el vehículo. (Tabla 3). Para evaluar la funcionalidad de los testículos inyectados con z-VAD-FMK, se analizó la tasa de fertilidad en los individuos experimentales y controles en ratas maduras de 61 días de edad para lo cual se contabilizó el número de crías luego de haber hecho el cruce con hembras sin tratamiento. El promedio de crías por camada fue de  $6,7 \pm 4,2$  para el grupo tratado con el inhibidor,  $8 \pm 7$  para el grupo tratado solo con el vehículo y  $9,7 \pm 1,5$  para el grupo control. Los resultados no revelaron diferencias significativas en la capacidad fecundante de los animales tratados con el inhibidor versus los controles.

Tabla 3: Morfometría de testículos de ratas adultas inyectadas en su prepubertad (21 días) con el inhibidor general de caspasas z-VAD-FMK

	z-VAD-FMK	Vehículo	Control
Diámetro Túbulo ( $\mu\text{m}$ )	96,21 $\pm$ 5,23	92,86 $\pm$ 6,09	97,06 $\pm$ 5,63
Área Túbulo ( $\mu\text{m}^2$ )	482,72 $\pm$ 9,68	449,78 $\pm$ 8,29	446,12 $\pm$ 9,28
Altura del Epitelio ( $\mu\text{m}$ )	8,36 $\pm$ 0,12	8,20 $\pm$ 0,11	8,12 $\pm$ 0,13

Para cada medición morfométrica se observaron 100 túbulos de tres cortes histológicos diferentes (300 túbulos). No se observan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Para evaluar el progreso normal de la espermatogénesis se cuantificaron los túbulos seminíferos entre los estadios I y VII del proceso espermatogénico (Fig 13 A). Entre estos estadios se deberían haber desarrollado al menos dos líneas de espermátidas, asegurando la diferenciación hasta el estadio XV y de espermátidas hasta el estadio XV. Esta es una manera fácil de poder evaluar el avance normal de la espermatogénesis pues en los túbulos las células germinales más diferenciadas son espermátidas (Figura 13B) que aun no toman la característica forma de espermátidas elongadas (Figura 13C). el porcentaje de túbulos con estadios entre el I-VII fue de  $17,67 \pm 0,67 \%$ , en tanto que en los controles fue de  $16,33 \pm 1,33 \%$  : Estos dos valores no resultaron ser significativamente distintos.

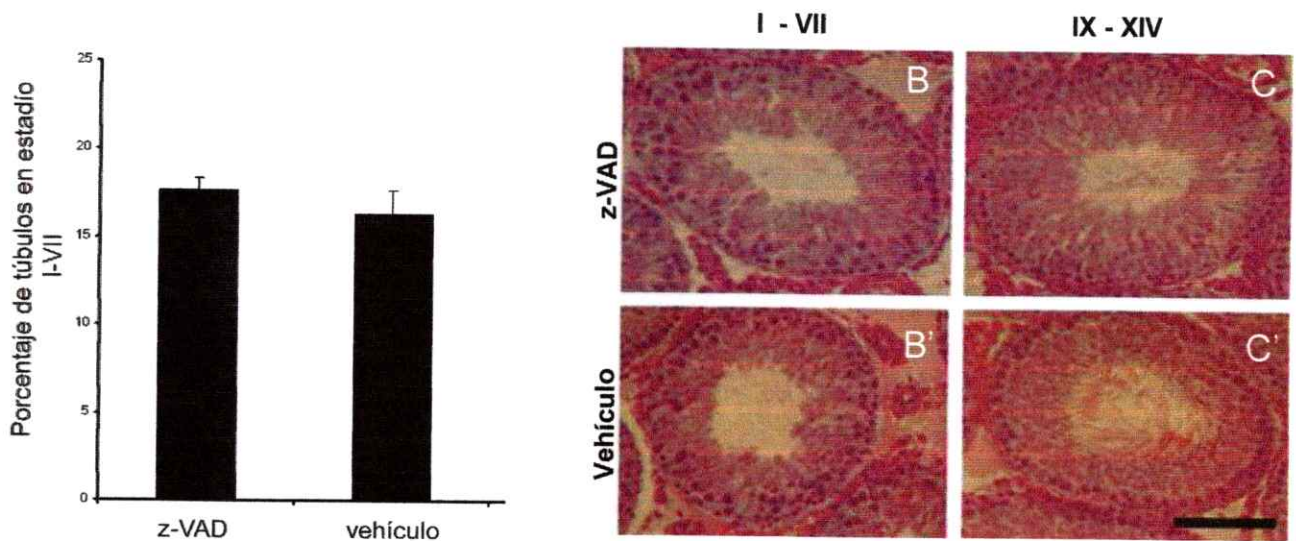


Figura 13: La inhibición de caspasas no afecta el normal desarrollo de la espermatogénesis.

A) La contabilización de túbulos entre el estadio I y VII de desarrollo se utilizó como una medida indirecta de evaluar el desarrollo correcto de la espermatogénesis, el cual no se vió afectado por z-VAD-FMK. En el panel de la derecha se observan túbulos entre los estadios I-VII de testículos tratados con pan-inhibidor y vehículo (B y B' respectivamente), y túbulos con mayor estadios de diferenciación bajo los mismos tratamientos (C y C'). Barra: 50  $\mu$ m.

Por lo tanto, el progreso normal de la espermatogénesis no se vio afectado comparando el grupo de animales tratados con el inhibidor con los animales del grupo control, tratados solo con el vehículo.

### 5.5.2 Efectos de la inhibición de caspasas sobre diferentes marcadores de diferenciación celular de túbulos seminíferos.

Para verificar de manera adicional un efecto de la inhibición temprana de caspasas sobre el desarrollo de la espermatogénesis, se analizaron cortes

histológicos de las ratas adultas inyectadas a los 21 días de edad con el pan-inhibidor con diferentes marcadores.

La Acrosina es una serina-proteasa específica del acrosoma (organelo ubicado en la cabeza de los espermatozoides que contiene las enzimas hidrolíticas que le permiten atravesar la Zona Pelucida). La acrosina es almacenada de forma pro-enzima, y es activada al ser liberada junto con las otras enzimas acrosomales en el proceso conocido como Reacción Acrosomal, al momento del encuentro entre los gametos masculino y femenino. Así, la acrosina es un muy buen marcador de la espermiogénesis, es por esto que quisimos evaluar su presencia en testículos inyectados con el pan-inhibidor. No se observaron diferencias en el patrón de distribución de acrosina en los testículos inyectados con z-VAD-FMK, mostrando que su ubicación específica sigue apareciendo en el acrosoma de las células germinales ya diferenciadas a espermatozoides (Figura 14 A-C).

En segundo lugar, se utilizó la proteína del complejo sinaptotémico SCP3, la cual tampoco mostró diferencias en testículos tratados con el inhibidor, su ubicación fue altamente específica en espermatocitos localizados cerca de lámina basal (Figura 14 D-F). Por último se utilizó tubulina como marcador de citoesqueleto, ya que esta proteína está presente en los microtúbulos de dicha estructura. No se observaron diferencias entre los testículos estudiados en cuanto a la localización de la tubulina, la cual se observó tanto en espermátidas

como en los flagelos de los espermatozoides localizados en el lumen del testículo (Figura 14 G-I).

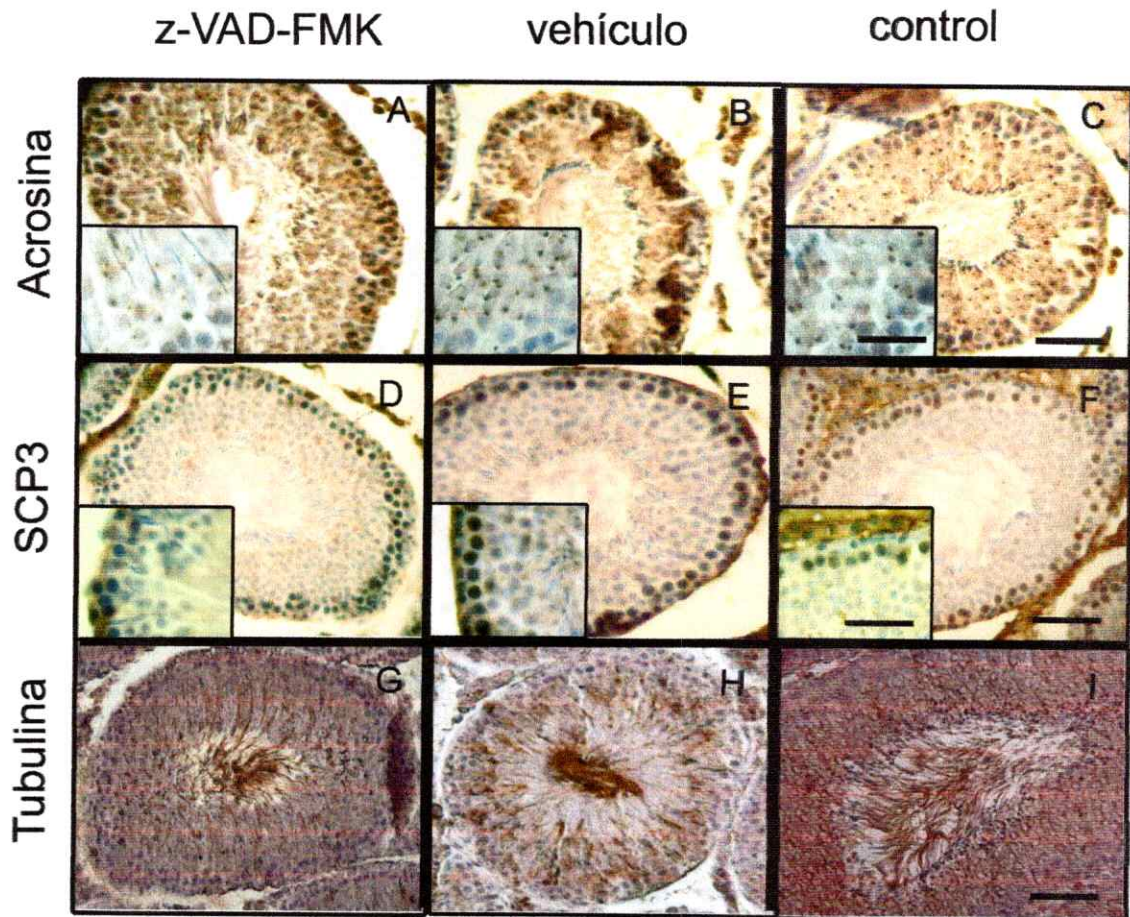


Figura 14: z-VAD-FMK no afectó la distribución ni presencia de diferentes marcadores en testículos de ratas adultas.

Inmunohistoquímica realizada en contra de la proteína Acrosina (A-C) no reveló diferencias entre los testículos tratados con z-VAD-FMK en comparación con los controles, a su vez ni la distribución del marcador del complejo sinaptotémico SCP3 (D-F) o la del marcador de citoesqueleto Tubulina (G-I) se vieron afectados por el inhibidor. Escala de barras: cuadros grandes: 25 µm; insertos de A-C: 10 µm; insertos de D a F: 25 µm.

## 6. DISCUSIÓN

En esta tesis se muestra la presencia de actividad de las caspasas en la ejecución de la muerte celular (apoptosis) fisiológica que se produce durante la espermatogénesis de la rata. Además, se descarta que una inhibición temprana y general de caspasas utilizando un pan-inhibidor, cause efectos cualitativos considerables durante la normal progresión de la espermatogénesis y posteriormente sobre la fertilidad.

La apoptosis o muerte celular programada juega un rol fundamental en la homeostasis y en el desarrollo de todos los organismos multicelulares. Tanto un exceso como un déficit de apoptosis conllevan a consecuencias patológicas como cáncer, desordenes neurodegenerativos, cardiomiopatías o infertilidad (Shi Y, 2002). La muerte celular programada en las células germinales participa y juega un rol crítico en el número final de espermatozoides que se producen en cada especie (Sinha Hikim y Swerdloff Ronald, 1999). La principal hipótesis que explica esta apoptosis es que aquellas células germinales que no son capaces de ser sustentadas por las células de Sertoli sufren la muerte celular, ya sea por falta de señales de supervivencia, como el stem cell factor (SCF), o por una activación de señales de muerte autónomas en la célula germinal. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la apoptosis fisiológica (o espontánea) durante la espermatogénesis son poco claros.

La ejecución de la apoptosis involucra la activación de una serie de cisteíno

proteasas llamadas caspasas. Recientemente se mostró que la apoptosis que ocurre durante la primera ronda de la espermatogénesis se correlaciona con la activación de caspasa-3, -8 y -9 a los 25 días de edad en la rata (Moreno et al, 2006). Sin embargo, en este estudio las mediciones de actividad enzimática de caspasas y de conteo de células TUNEL(+) se llevaron a cabo con intervalos de cinco días por lo cual fue necesario precisar la edad con mayor actividad de caspasas para poder elaborar una mejor estrategia para estudiar dicho evento. Esta tesis mostró que la actividad enzimática de las caspasas-3 -8 y-9 tiende a aumentar hacia los 22 días de edad en la rata (Figura 5), basándonos en este resultado decidimos realizar las inyecciones intratesticulares a los 21 días de edad para las evaluaciones posteriores.

La inhibición de las caspasas se ha abordado desde tres perspectivas diferentes: primero, a través de la expresión de proteínas virales como por ejemplo CrmA, el cual es un potente inhibidor de caspasa-1, -10 y -8. CrmA puede inhibir la apoptosis inducida vía factor de necrosis tumoral (TNF) o por el ligando FAS. Sin embargo, CrmA no puede inhibir fuertemente otras caspasas como la caspasa-3, -6 o -7 (Callus BA et al, 2006). En segundo lugar, también se ha utilizado la expresión de proteínas inhibitorias de la apoptosis (IAPs). Dentro de esta familia de proteínas, la más estudiada es XIAP, la cual inhibe la activación de la procaspasa-9 al unirse al extremo procesado de la subunidad grande de la caspasa-9 previniendo su dimerización y subsiguiente activación. Además, XIAP puede unirse a los sitios catalíticos activos de las caspasas

efectoras -3 y -7, y bloquear su actividad. Finalmente, la inhibición de caspasas con tratamientos farmacológicos ha sido una herramienta exitosa para el estudio de la actividad de las caspasas en modelos experimentales. Al igual que los inhibidores virales, los inhibidores peptídicos sintéticos se unen como pseudosustratos a los sitios catalíticos activos de las caspasas blanco inhibiendo así su actividad catalítica (Ekert PG et al 1999; Callus BA et al, 2006). La idea de abordar esta última estrategia en nuestro estudio fue para, precisamente, evaluar los efectos directos que causan los inhibidores sintéticos sobre las caspasas endógenas en modelos *in vivo*. Con esto nos evitamos las dudas que podrían surgir al sobreexpresar inhibidores endógenos o fisiológicos de caspasas, como los de la familia de las IAPs, los cuales podrían alterar otras proteínas u otras vías al no ser dirigidos de manera específica contra las caspasas como lo hacemos al inyectar inhibidores farmacológicos específicos.

Al comienzo de este estudio no estaba descrito el uso de inhibidores peptídicos en testículos *in vivo* para la inactivación de caspasas. La inyección intratesticular fue el método utilizado para solucionar el problema de la administración del fármaco y asegurar su distribución a las diferentes regiones del testículo. Para no causar efectos inflamatorios sobre el órgano, se inyectaron 10 µl del inhibidor VAD-FMK asociado a la sonda fluorescente FITC demostrando que el inhibidor es capaz de alcanzar la totalidad del testículo de 22 días de edad de la rata y además, este experimento es un antecedente que demuestra cualitativamente la gran activación de caspasas a dicha edad (Figura



6). Por lo tanto se demostró que el método de la inyección intratesticular es efectivo para la administración de fármacos al testículo.

Los inhibidores peptídicos son disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) para su preparación. Antecedentes previos de nuestro laboratorio muestran que la concentración 1  $\mu\text{M}$  de inhibidores peptídicos es suficiente para causar inhibición de caspasas. Es más, a concentraciones mayores se observaron daños en los testículos tratados equivalentes a los controles de vehículo que podrían ser asociados a la citotoxicidad del DMSO (dato no mostrado). La constante inhibitoria ( $K_i$ ) de z-VAD-FMK varía según los diferentes tipos de caspasas. En ninguna medición de actividad enzimática de caspasa-3 en testículos inyectados con inhibidores peptídicos se observaron variaciones significativas con respecto al vehículo (Figura 6, 7 y 8). Si suponemos que al entrar en apoptosis tanto la vía intrínseca como extrínseca generan la activación de caspasas efectoras como la caspasa-3, una posible hipótesis sería que la concentración de la caspasa-3 es mayor a la de las caspasas iniciadoras -8 y -9. De ser así, una posible explicación para que ninguna inhibición peptídica haya acusado un efecto sobre la actividad de caspasa-3 en este estudio podría ser que la concentración del inhibidor hubiese estado bajo el  $K_i$  del mismo para esta caspasa en particular, pero no así para caspasas iniciadoras. Además, z-VAD-FMK no fue capaz de inhibir significativamente ninguna actividad enzimática medida pero sí tuvo efectos sobre sustratos apoptóticos como PARP y P115 (Figura 6), esto quizás, debido a que a pesar

de que los inhibidores con tres residuos aminoacídicos tienen un mayor espectro de inhibición, es decir pueden inhibir una mayor cantidad de caspasas diferentes, y de que los péptidos más cortos son más permeables que los tetrámeros, la inhibición general disminuye la probabilidad de inhibir a las caspasas de manera más selectiva. En otras palabras, el pan-inhibidor inhibe más caspasas totales y por ende menos cantidad de las caspasas específicas que están iniciando la cascada de activación. Esta hipótesis podría explicar por qué los inhibidores específicos de caspasa-8 y -9 causaron efectos significativos sobre las actividades de estas dos caspasas (Figura 7 y 8).

Sin embargo, la actividad enzimática de las caspasas se vio reflejada en la proteólisis de diferentes sustratos blancos y finalmente la fragmentación del DNA. La inhibición de caspasa-8 no sólo causó una disminución del clivaje de PARP (Figura 8), sino que una disminución del número de células TUNEL(+) en el túbulo no así la inhibición de caspasa-9. (Figura 10), lo cual sugiere una mayor contribución de la caspasa-8 en la ejecución de la apoptosis. Este resultado contrasta enormemente con lo observado con el inhibidor de la caspasa-9 (Figura 8). En este caso no observamos una alteración en la actividad enzimática de la caspasa-3, ni en la proteólisis de sus subunidades o las de la caspasa-8 o en la fragmentación del DNA. Es por ello que pensamos que la actividad de la caspasa-9 contribuye en muy poca medida a la ejecución de la apoptosis durante la espermatogénesis.

En conclusión en esta tesis hemos logrado discriminar la contribución relativa de distintas caspasas en la apoptosis fisiológicas de células germinales, utilizando inhibidores sintéticos específicos para cada enzima. Pudimos establecer una contribución importante de la caspasas-8, pero no tanto de la caspasa-9 en la ejecución de la apoptosis.

Además de confirmar la participación de las caspasas en la apoptosis es necesario observar si juegan algún rol dual participando en el desarrollo de la espermatogénesis. Esto, ya que a pesar de que las caspasas son las clásicas ejecutoras de la muerte celular programada, en el modelo de la espermatogénesis ya se han visto que son importantes en la diferenciación celular en *Drosophila* (Arama et al, 2003, Huh J. et al, 2004). La inhibición general de caspasas ocupando una sola inyección de z-VAD-FMK a los 21 días de edad no causó efectos cualitativos ni cuantitativos en las características morfológicas de los túbulos seminíferos adultos (Figura 12, Tabla 1), lo cual sugiere que este tratamiento no causó efectos en el desarrollo de la espermatogénesis. La acrosina es una serino-proteasa presente en el acrosoma, sobre el núcleo del espermatozoide, y es una de las enzimas encargadas de la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida durante la fertilización del ovocito; al pasar de su forma inactiva a activa al contacto con las proteínas específicas de la zona pelúcida como lo son ZP1, ZP2 Y ZP3 (en ratón) (Wassaman 1999). Sus características la hacen un muy buen marcador del proceso de espermiogénesis, es decir de la etapa de diferenciación final de

los espermatozoides. La inhibición temprana de caspasas no causó efectos sobre el patrón de expresión proteico de la acrosina en adultos (Figura 15). Tampoco se observaron efectos en marcadores de citoesqueleto como la tubulina o de meiosis como la proteína del complejo sinaptonémico SCP3 (Figura 14). Una de las explicaciones alternativas para este resultado, podría ser que la inhibición temprana sí causó efectos sobre la progresión espermatogénica los cuales fueron revertidos durante la continuación del proceso. Una posible alternativa para aclarar este punto puede ser la utilización de bombas que vayan liberando los inhibidores de manera continua y progresiva el inhibidor a fin de bloquear las caspasas durante toda la extensión de la espermatogénesis. Otra de las posibilidades para explicar por qué no se ven efectos en la progresión de la espermatogénesis pudiera recaer en las dosis de inhibidores utilizadas, las que por un lado sí alcanzan para afectar el rol apoptótico de las caspasas en el modelo pero no para afectar una posible función en la progresión de la espermatogénesis. Por último es posible que la inhibición de las caspasas, en células en el proceso de apoptosis induzca, mecanismos independientes de estas enzimas como la autofagia, lo que implica que aquellas células que fisiológicamente estaban destinadas a morir lo hagan de todas maneras.

## CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Los resultados aquí presentados indican la participación de la actividad de caspasas en el proceso de apoptosis fisiológica durante la primera ronda de la espermatogénesis de la rata. Además, los datos sugieren una participación importante de la caspasa-8 y por consiguiente de la vía extrínseca en esta muerte celular. Por último, e una inhibición única y temprana de caspasas no logra afectar la progresión normal de la espermatogénesis, sin descartar que estas proteasas participen en procesos de diferenciación.

Dado el creciente desarrollo de estrategias contra enfermedades degenerativas que involucran procesos apoptóticos, este estudio confirma la alternativa de la utilización de inhibidores farmacológicos de caspasas en el presente sistema como método eficaz para la inhibición de la apoptosis. Una de las proyecciones para la continuación del trabajo sería la determinación de las vías de señalización río arriba de la activación de las caspasas en la generación de la apoptosis durante la espermatogénesis, para poder saber con certeza cuales son los mecanismos que se activan durante este proceso. Por otro lado, esta tesis deja abierta aun la pregunta del rol de las caspasas durante la diferenciación o la progresión de la espermatogénesis, por lo cual se hace necesario continuar los estudios respecto a este punto.

## 7. LITERATURA CITADA

1. ADASHY Y, ROCK J.A AND ROSENWAKS Z. "Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology". E.. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.
2. ARAMA E, AGAPITE J, STELLER H. "Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in Drosophila" Dev Cell. (2003) 4(5):687-97.
3. BERGERON L, PEREZ GI, MACDONALD G, SHI L, SUN Y, JURISICOVA A, VARMUZA S, LATHAM KE, FLAWS JA, SALTER JC, HARA H, MOSKOWITZ MA, LI E, GREENBERG A, TILLY JL, YUAN J. "Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice ".Genes Dev. (1998) 1;12(9):1304-14.
4. BHARDWAJ A, AGGARWAL BB. "Receptor-mediated choreography of life and death" J Clin Immunol. 2003 23(5):317-32.
5. BRADFORD MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" Anal Biochem. (1976) 7;72:248-54.
6. BRAUN JS, NOVAK R, HERZOG KH, BODNER SM, CLEVELAND JL, TUOMANEN EI. "Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis" Nat Med. (1999) 5(3):298-302.
7. CALLUS BA, VAUX DL. "Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical" Cell Death Differ. 2006 Sep 8.
8. CHAI J, SHIOZAKI E, SRINIVASULA SM, WU Q, DATTA P, ALNEMRI ES, SHI Y. "Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP" Cell. (2001) 9;104(5):769-80. Erratum in: Cell (2001) 2;107(3):409.
9. CHIU R, NOVIKOV L, MUKHERJEE S, SHIELDS D. "A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis" J Cell Biol. (2002) 25;159(4):637-48.
10. CLEMONT, Y. "The cicle of the seminierous epithelium in the man". Am. J. Anat. (1963) 112: 35-51
11. COOKE HJ, AND SAUNDERS PT. Mouse models of male infertility" Nat Rev Genet. (2002) 3(10):790-801.

12. DE VRIES KJ, WIEDMER T, SIMS PJ, GADELLA BM. "Caspase independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells". *Biology of Reproduction* (2003) 68: 2122-2134
13. EARNSHAW, WILLIAM C. MARTINS, LUIS M. KAUFMANN, SCOTT H "MAMMALIAN CASPASES: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis." *Annual Review of Biochemistry*, (1999) 68: 383-42.
14. EKERT PG, SILKE J, VAUX DL. "Caspase inhibitors." *Cell Death Differ.* (1999) 6:1081-6.
15. FISCHER U, JANICKE R.U, SCHULZE-OSTHOFF K. "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates" *Cell Death Differ.* (2003) 10:76-100.
16. GARRIDO C, GALLUZZI L, BRUNET M, PUIG PE, DIDELOT C, KROEMER G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria" *Cell Death Differ.* (2006) 13:1423-33.
17. GAVRIELI Y, SHERMAN Y, AND SA. BEN-SASSON. "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation". *The Journal of Cell Biology* (1992) 119: 493-501.
18. GERSCHENSON L.E AND R.J ROTELLO. "Apoptosis: a different type of cell death" *the Faseb Journal* (1992) 6: 2450-2455.
19. HAIL JR N, B.Z. CARTER, M. KONOPLEVA AND M. ANDREEFF. "Apoptosis effector mechanism: A requiem performed in different keys" *Apoptosis* (2006) 11:889-904.
20. HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis" *Nature.* (2000) 12:770-6.
21. HERCEG Z, WANG Z.Q. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death" *Mutat Res.* (2001) 477:97-110.
22. HUCKINS C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: An analysis using a simplified classification of the germinal epithelium" *Anat Rec.* (1978) 190:905-26.

23. HUH J.R, VERNOOY S.Y, YU H, YAN N, SHI Y, GUO M, HAY BA. Multiple apoptotic caspase cascades are required in nonapoptotic roles for *Drosophila* spermatid individualization." *PLoS Biol.* (2004) 2:E15.
24. KENNEDY N.J, KATAOKA T, TSCHOPP J, BUDD R.C. Caspase activation is required for T cell proliferation." *J Exp Med.* (1999) 20;190:1891-6.
25. KERR J.F, WYLLIE AH AND CURRIE A.R. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics" *Br J Cancer.* (1972) 26:239-57.
26. KNUDSON C.M TOURTELLOTTE W.G, BROWN GA, KORSMEYER S.J. "Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death." *Science.* (1995) 6;270:96-9.
27. KRISHNAMURTHY H, WEINBAUER G, ASLAM H, YEUNG C AND NIESLAG E. "Quantification of apoptotic testicular germ cell in normal and methoxyacetic acid-treated mice as determined by flow cytometry". *Journal of Andrology* (1998): 19: 710-717.
28. LAEMMLI U.K. (1970) "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4" *Nature* 227: 680-685
29. L.E GERSCHENSON AND R.J ROTILLO. "Apoptosis: a different type of cell death" *The FASEB Journal* (1992) 6:2450-2455
30. LI H, ZHU H, XU C.J, YUAN J. "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis" *Cell.* (1998) 21;9:491-501.
31. LIU H, CHANG D.W, YANG X. "Interdimer processing and linearity of procaspase-3 activation. A unifying mechanism for the activation of initiator and effector caspases" *J Biol Chem.* (2005) 25;280:11578-82.
32. LIZAMA C AND MORENO R.D "Up-regulation de CD95 (Apo1/Fas) is associated with spermatocyte apoptosis during the first round of spermatogenesis in the rat " *Apoptosis.* 2006 In Press.
33. LOCKSHIN R.A AND WILLIAMS C.M. "Programmed Cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of intersegmental muscles of silkworms" *Journal of Insect Physiology* (1964) 10:643



34. LUO X, BUDIARDJO I, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X. "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors" *Cell*. (1998) 21;94:481-90.
35. MATSUKI S, IUCHI Y, IKEDA Y, SASAGAWA I, TOMITA Y, FUJII J. "Suppression of cytochrome c release and apoptosis in testes with heat stress by minocycline" *Biochem Biophys Res Commun*. (2003) 19;312:843-849.
36. MCCARREY J. "Development of the Germ Cell" in *Cell and Molecular Biology of the Testis* (Desfardias C. and Ewing L. ed.). Oxford University Press (1993)
37. MCMANUS J.F.C "Histological demonstration of mucin after periodic acid" *Nature*, 158:202, 1946.
38. MORENO R.D, LIZAMA C, URZUA N, VERGARA S.P, REYES J.G. "Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat." *Cell Tissue Res*. (2006) 325:533-540.
39. NICHOLSON D.W. "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." *Cell Death Differ*. (1999) 6:1028-1042.
40. ÖZÖREN N. AND WAFIK S. EL-DEIRY "Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells" *Semin Cancer Biol*. (2003) 13:135-147.
41. PUTHENVEEDU M.A, LINSTEDT A.D. "Evidence that Golgi structure depends on a p115 activity that is independent of the vesicle tether components giantin and GM130" *J Cell Biol*. (2001) 15;155:227-238.
42. HISTOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF THE TESTIS. Edited by L.D. Russell, R.A. Ettlín, A.P. Sinha Hikim and E.D. Clegg. Cache River Press, Clearwater, 1990.
43. RIEDL S.J, SHI Y. "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis" *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2004) 5:897-907
44. RODRIGUEZ I, ODY C, ARAKI K, GARCIA I, VASSALLI P. "An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis." *EMBO J*. (1997) 1;16:2262-2270.

45. ROHN T.T, CUSACK S.M, KESSINGER S.R, OXFORD J.T. "Caspase activation independent of cell death is required for proper cell dispersal and correct morphology in PC12 cells." *Exp Cell Res.* (2004) 15;295:215-225.
46. RUSSELL L.D, CHIARINI-GARCIA H, KORSMEYER S.J, KNUDSON C.M. "Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis." *Biol Reprod.* (2002) 66:950-958.
47. SHI Y. "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Mol Cell.* (2002) 9:459-470.
48. SINHA HIKIM A.P AND R.S SWERDLOFF. "Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis" *Reviews of Reproduction* (1999) 4: 38-47.
49. SINHA HIKIM AP, LUE Y, DIAZ-ROMERO M, YEN PH, WANG C, SWERDLOFF RS. "Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis." *J Steroid Biochem Mol Biol.* (2003) 85:175-182.
50. SOHN D, SCHULZE-OSTHOFF K, JANICKE R.U. "Caspase-8 can be activated by interchain proteolysis without receptor-triggered dimerization during drug-induced apoptosis." *J Biol Chem.* (2005) 18;280:5267-5273.
51. TAKATANI T, TAKAHASHI K, UOZUMI Y, SHIKATA E, YAMAMOTO Y, ITO T, MATSUDA T, SCHAFFER SW, FUJIO Y, AZUMA J. "Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome" *Am J Physiol Cell Physiol.* (2004) 287:C949-953.
52. THORNBERRY, BULL, CALAYCAY, CHAPMAN, HOWARD, KOSTURA, MILLER, MOLINEAUX, WEIDNER, AUNINS, ELLISTON, AYALA, CASANO, CHIN, DING, EGGER, GAFFNEY, LIMJUCO, PALYHA, RAJU, ROLANDO, SALLEY, YAMIN, LEE, SHIVELY, MACCROSS, MUMFORD, SCHMID AND TOCCI. "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." *Nature.* (1992) 30;356:768-774.
53. VAN LOO G, SAELENS X, VAN GURP M, MACFARLANE M, MARTIN S.J, VANDENABEELE P. "The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet" *Cell Death Differ.* (2002) 9:1031-1042.

54. VERA Y, RODRIGUEZ S, CASTANARES M, LUE Y, ATIENZA V, WANG C, SWERDLOFF R.S, SINHA HIKIM A.P. "Functional role of caspases in heat-induced testicular germ cell apoptosis." *Biol Reprod.* (2005) 72:516-522.
55. WANG Y, SUOMINEN J.S, PARVINEN M, RIVERO-MULLER A, KIIVERI S, HEIKINHEIMO M, ROBBINS I, TOPPARI J. "The regulated expression of c-IAP1 and c-IAP2 during the rat seminiferous epithelial cycle plays a role in the protection of germ cells from Fas-mediated apoptosis." *Mol Cell Endocrinol.* (2005) 21; 245:111-120.
56. WANG Z.Q, STINGL L, MORRISON C, JANTSCH M, LOS M, SCHULZE-OSTHOFF K, WAGNER E.F. "PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis" *Genes Dev.* (1997) 15;11:2347-2358.
57. WASSARMAN P.M "Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion" *Cell* (1999) Vol. 96, 175-183.
58. WU G, CHAI J, SUBER T.L, WU J.W, DU C, WANG X, SHI Y. "Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO" *Nature.* (2000) 21-28;408:1008-1012.
59. ZHENG S, TURNER T.T, LYSIAK J.J. "Caspase 2 activity contributes to the initial wave of germ cell apoptosis during the first round of spermatogenesis" *Biol Reprod.* (2006) 74:1026-1033.