

MATERIALS I MÈTODES

I. MATERIALS

I.1. Els ratolins transgènics per la SHBG/ABP de rata

El ratolí és va desenvolupar mitjançant la microinjecció pronuclear d'un fragment de 5.5 Kb de DNA genòmic de rata, que contenia 1.5 Kb de la regió promotora i 4 Kb de regió codificant (Reventós, J. et al. 1993). Els ratolins transgènics es van identificar per la tècnica de PCR a partir de DNA genòmic de cua, utilitzant *primers* específics pels exons 1 i 7 (Reventós, J. et al. 1993), o bé per la tècnica de *Southern Blot* (Southern, E.M. 1975).

I.1.1. RT-PCR

Es van utilitzar 0.02 µg de DNA genòmic per ser amplificat en un volum final de reacció de 50 µl, amb la presència de 2 U de EcoTaq polimerasa (Ecogen, Barcelona, Espanya), 0.05 mM de Taq *Buffer*, 0.05 mM de MgCl₂, 10 mM de cadascun dels nucleòtids, i 0.1 µM dels *primers* pels exons 1 i 7. Les amplificacions es van fer amb un termociclador Perkin Elmer model 2400 (Cupertino, CA, USA). Les condicions d'amplificació van ser: 94° C – 3 min.; 30 cicles de 94° C – 15 seg., 65° C – 30 seg., 72° C - 45 seg.; 72 ° C – 10 min. Sota aquestes condicions s'amplifica un fragment de 2.5 Kb.

I.1.2. *Southern Blot*

Va consistir en una digestió de 10 µg de DNA genòmic amb l'enzim EcoRI (0.4 U/µl) en un volum final de 100 µl a 37° C durant 3 hores. Es van separar els diferents fragments de DNA en un gel d'agarosa al 0.8% i es van transferir a una membrana de *Nylon*. Es va utilitzar com a sonda un fragment complementari a la regió 5 min. del DNA genòmic de SHBG/ABP de rata insertat, marcat amb ³²P-dATP amb terminal transferasa (TdT) (1.4 U/µl) (Boehringer Mannheim) en presència del tampó de la TdT i Co Cl₂ (4.4 mM) a 37 ° C durant 1 h. La sonda es va precipitar amb 0.3 M d'acetat sòdic i etanol absolut fred, desnaturalitzar i utilitzar per hibridar la membrana a 65 ° C durant una nit. A continuació es van fer 3 rentats a temperatura ambient de 15 min. amb SSPE 2X, SSPE 1X i SSPE 0.1X. Es va exposar l'autoradiografia durant una nit i el seu revelat va permetre detectar la banda de 5.5 Kb.

Per tal d'estudiar els problemes de fertilitat descrits en aquest ratolí transgènic a les anteriors publicacions, es van fer creuaments continuats dels ratolins transgènics amb ratolins normals de les soques CD1 i C57BL/6. Per dur a terme els experiments es van utilitzar ratolins homozigots, heterozigots i normals (germans dels no transgènics). Els animals transgènics i no transgènics de la mateixa ventrada es van sacrificar a l'hora sempre que va ser possible. Els animals van ser sacrificats per dislocació cervical abans de la recollida dels teixits.

Tots els experiments van ser portats a terme segons les normes estàndards institucionals, que estableixen el govern espanyol i la Comunitat Europea (BOE 67, 3/18/88, Real Decreto 223/1988, i BOE 256, 10/25/90).

I.2. Els ratolins transgènics per la SHBG/ABP humana

Es van generar dues línies diferents de ratolins transgènics per a la SHBG/ABP humana, una línia de ratolins transgènics que contenia 11 Kb de DNA genòmic de SHBG/ABP humana (shbg11) i els que contenen 4.3 Kb de DNA genòmic de SHBG/ABP humana (shbg4). Totes dues línies contenen els 8 exons que codifiquen per a la SHBG/ABP humana, però els shbg11 contenen 6 Kb de DNA 5 min. Flankejant i els shbg4 només 0.9 Kb. Els animals transgènics van ser detectats també per *Southern Blot*, el DNA genòmic de la cua es va digerir amb EcoRI, els fragments de DNA separats en un gel d'agarosa van ser transferits a una membrana de *Nylon*. La membrana va ser hibridada amb una sonda complementària als exons 6-8 del cDNA de la SHBG/ABP humana, que va ser marcada també amb ³²P-dATP. Els animals van ser sacrificats per dislocació cervical.

I.3. Línies cel.lulars

S'han fet servir diferents línies cel.lulars, CHO, PC3, LNCaP, CAHPV-10, PZHPV7. Les característiques línies cel.lulars són:

- PC3: (ATCC CRL – 1435). Línia de cèl.lules epitelials que prové d'una metàstasi osea d'un adenocarcinoma d'un home de 62 anys. Aquestes cèl.lules són tumorigèniques en ratolins *nude*. El medi de cultiu va ser DMEM (Gibco-BRL, Bethesda, MD)

complementat amb 10% de sèrum boví fetal (FBS), aminoàcids essencials i penicil.lina/estreptomicina. Les condicions del cultiu van ser 37° C i 4% de CO₂.

- LNCaP: (ATCC CRL – 1740). Línia de cèl.lules epitelials que prové d'un nòdul linfàtic amb metàstasi provinent d'un carcinoma prostàtic d'un home de 50 anys. Són cèl.lules tumorogèniques en ratolins *nude*. El medi de cultiu va ser DMEM (Gibco-BRL, Bethesda, MD) complementat amb 10% FBS, aminoàcids essencials i penicil.lina/estreptomicina. Les condicions del cultiu van ser 37° C i 4% de CO₂.
- CAHPV10: (ATCC CRL – 2220). Línia de cèl.lules epitelials que prové d'un adenocarcinoma de pròstata d'un home de 63 anys, però que han estat transfectades amb Papilomavirus 18 humà (HPV-18). Aquestes cèl.lules no són tumorogèniques en ratolins *nude*. El medi de cultiu que es va utilitzar per a créixer les cèl.lules va ser Keratinocyte-Serum Free Medium (Gibco-BRL, Bethesda, MD) complementat amb 5 ng/ml d'EGF recombinant humana i 0.05 mg/ml d'extracte pituitari boví. Les condicions del cultiu van ser 37° C i 4% de CO₂.
- PZHPV7: (ATCC CRL – 2221). Línia de cèl.lules epitelials que prové d'una pròstata normal d'un home de 70 anys. Les cèl.lules van ser transformades amb Papilomavirus 18 humà (HPV-18). Aquestes cèl.lules no són tumorogèniques en ratolins *nude*. El medi de cultiu que es va utilitzar per a créixer les cèl.lules va ser Keratinocyte-Serum Free Medium (Gibco-BRL, Bethesda, MD) complementat amb 5 ng/ml d'EGF recombinant humana i 0.05 mg/ml d'extracte pituitari boví. Les condicions del cultiu van ser 37° C i 4% de CO₂.
- CHO: (ATCC CCL – 61). Línia de cèl.lules epitelials que provenen d'una biòpsia d'ovari de hamster xinesa adulta. El medi de cultiu que es va utilitzar per a créixer les cèl.lules va ser DMEM (Gibco-BRL, Bethesda, MD) complemtnat amb 10% FBS, aminoàcids essencials i penicil.lina/estreptomicina. Les condicions del cultiu van ser 37° C i 4% de CO₂.

I.4. Mostres Humanes

I.4.1. Mostres de pròstata

Es van obtenir mostres de pròstata de donants i de pacients amb càncer de prostata. Aquestes mostres es van recollir a quiròfan durant la recollida d'òrgans en el cas dels donants i durant la prostatectomia radical en el cas dels pacients amb càncer. Les mostres del tumor es van recollir seguint les indicacions del cirurgià i amb la informació de la biòpsia. Es van incloure en OCT i seguidament en nitrogen líquid.

Posteriorment es van fer talls de 15 μm – 20 μm amb el criostat, que es van fixar amb PF 4%, i després de rentar-los amb PBS es van deshidratar amb concentracions creixents d'etanol. Les seccions es van portar a la patòloga per que les analitzés i confirmés la presència de tumor en els talls amb càncer.

I.4.2. Mostres d'esperma total, líquid seminal i espermatozous

Es van obtenir mostres d'esperma total i líquid seminal de diferents pacients normals. A més es va obtenir líquid seminal d'un pacient vasectomitzat. Pel que fa als espermatozous, provenien tant de pacients normals com de pacients amb problemes de fertilitat. Els espermatozous es van obtenir després de la prova de *swim-up*, és a dir, que estaven rentats, i es van resuspendre en PBS.

I.4.3. Mostres de testicle, epidídim i vesícules seminals

Es van obtenir mostres congelades de testicle, epidídim i vesícula seminal de donants. A més, es van obtenir mostres de testicle de biòpsies testiculars de pacients amb problemes de fertilitat.

II. MÈTODES

II.1. Tècniques en biologia cel.lular

II.1.1. Extracció de cèl.lules de Sertoli

Es van sacrificar els ratolins i se'ls van extreure els testicles, posant-los en 10 ml de medi de cultiu complementat amb penicil.lina-streptomicina (5 µg/ml) i anfotericina (5 µg/ml) (PSA). Una vegada a la campana de cultius es va procedir a:

1. Descapsulació dels testicles. Fer dos rentats dels testicles amb el medi de cultiu suplementat amb PSA. Descapsular els testicles utilitzant dues pinces i un bisturí. Una vegada descapsulats posar els testicles a una placa de petri amb 5 ml de medi de cultiu amb PSA.
2. Disgregació dels túbuls amb Colagenasa. Incubar els testicles descapsulats amb una solució de Colagenasa (0.9 mg/ml) en medi de cultiu amb PSA, en un volum final 50 ml, a 33° C i en agitació durant 10-15 min.. Acabar de disgregar els túbuls amb una pipeta de 10 ml. Posar els 50 ml en un tub i centrifugar a 800 rpm durant 10 min. Descartar el sobrenadant i resuspendre el *pellet* en 50 ml de medi amb PSA per inversió. A continuació deixar sedimentar durant 15 min., els túbuls es depositen al fons, i les cèl.lules de Leydig i altres cèl.lules intersticials es queden al sobrenadant. Eliminar el sobrenadant i fer una segona sedimentació afegint altre cop 50 ml de medi amb PSA. Un cop eliminat el sobrenadant, resuspendre el *pellet* en 3 ml de medi amb PSA.
3. Aïllament de les cèl.lules dels túbuls amb Colagenasa. Segona digestió de les mostres amb Colagenasa (0.8 mg/ml) a 33° C durant 15 min. Tot seguit centrifugar a 800 rpm durant 10 min. Descartar el sobrenadant i resuspendre el *pellet* en 5 ml de medi amb PSA. Acabar de dispersar les cèl.lules amb una xeringa i dos tipus d'agulles (19Gx 1 1/2 i 21Gx1 1/2) durant 10 min.
4. Comptatge de número total de cèl.lules. Barrejar 5 µl de la mostra amb 5 µl de *Trypan-blue* que tenyeix de color blau les cèl.lules amb la membrana plasmàtica trencada que

durant l'extracció esdevenen necròtiques. Calcular la viabilitat i el número total de cèl.lules.

5. Cultiu de les cèl.lules de Sertoli. El medi de cultiu de les cèl.lules de Sertoli va ser complimentat amb els reactius que apareixen a la següent taula:

	Concentració Stock	Concentració Treball	Quantitat per 50 ml
Insulina	10 mg/ml	10 µg/ml	50 µl
Transferrina	20 mg/l	10 µg/ml	25 µl
Vitamina C	2×10^{-3} M	10^{-4} M	25 µl
Vitamina E	20 mg/l	10 µg/ml	25 µl
Testosterona	1 mg/l	10^{-7} M	1.44 µl
Acid Retinòic	10^{-3} M	0.33 µM	16.4 µl
Retinol	10^{-3} M	0.33 µM	16.4 µl
Piruvat	1 M	1 mM	50 µl
FSH	10 µg/ml	10 ng/ml	0.5 µl
Penic. - Strep.	10000 IU/ml	100 IU/ml	500 µl
Nistatina	10000 IU/ml	10 IU/ml	50 µl

Les condicions pel cultiu que es van fer servir van ser de 37° C i 4% de pressió de CO₂, canviant el medi de cultiu cada dos dies.

II.1.2. Aïllament de cèl.lules germinals

Pel que fa a la línia de ratolins transgènics per la SHBG/ABP de rata es van aïllar les cèl.lules germinals de 3 ratolins no transgènics, 4 heterozigots i 3 homozigots, tots de 3 mesos d'edat. També es van aïllar cèl.lules germinals de testicles provinents de la línia de ratolins transgènics per l'SHBG/ABP humana, concretament de 6 ratolins transgènics shbg11, 6 ratolins transgènics shbg4, i 3 ratolins no transgènics.

El protocol que es va utilitzar per extreure les cèl.lules germinals va ser el mètode descrit per Weiss et al. (Weiss, M. et al. 1997). El protocol consisteix en:

1. Extracció dels testicles i descapsulació. Extreure els testicles i rentar-los amb PBS 1X complimentat amb PSA (PBS*). Descapsular i tallar durant 5 min. A continuació incubar en 100 ml PBS* durant 8 min.
2. Digestió amb Tripsina. Descartar el sobrenadant, i digerir els trossos del testicle amb tripsina (80 mg/ml) / PBS* a 33 ° C durant 10 min. Aturar la reacció afegint 25 mg/ml d'inhibidor de tripsina. Tot seguit afegir 5-10 ml de deoxiribonucleasa (0.4 mg/ml) i incubar a temperatura ambient durant 5 min.
3. Tallat i filtració. Tallar els túbuls allats en una placa de petri durant 30 min. i filtrar de manera seqüencial amb filtre de *nylon* de 100 µm de porus, fibra de vidre, i filtre de *nylon* de 20 µm de porus. Centrifugar la solució recuperada a 800 rpm durant 10 min.
4. Cultiu de 6h. Resuspendre el *pellet* en 15 ml de medi de cultiu DMEM/NUT mix F-12 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) complementat amb 10% de FBS. Incubar la suspensió de cèl.lules en flascons a 37° C i 4% CO₂ durant 6 hores. Recollir el sobrenadant, que està lliure de cèl.lules de Sertoli, i centrifugar a 800 rpm durant 10 min. Resuspendre el *pellet* en citrat sòdic 0.4 M pH 2.35, i després d'una incubació de 24 hores, centrifugar a 800 rpm durant 10 min. i resuspendre el *pellet* en citrat sòdic 0.4 M pH 4.5 a una concentració final de 1x 10⁶ cèl.lules/ml.
El protocol va ser canviat en l'extracció de cèl.lules germinals de 3 ratolins transgènics shbg11 ja que no es va realitzar el filtrat amb fibra de vidre, obtenint-se per tant cèl.lules germinals més espermatozous.

II.1.3. Extracció de cèl.lules peritubulars

Es van extreure els testicles, i es van posar en PBS*. A continuació es van seguir els següents passos:

1. Descapsulació dels testicles. Rentar dos cops els testicles en PBS*, i descapsular-los segons el protocol habitual.

2. Digestió amb Colagenasa. Incubats els testicles en medi de cultiu amb PSA i Colagenasa (0.9 mg/ml) a 33° C durant 15-20 min.
3. Sedimentació. Disgregar bé els túbuls amb una pipeta de 10 ml. A continuació barrejar bé i deixar sedimentar 10 min. Tot seguit descartar el sobrenadant i afegir 50 ml de medi de cultiu amb PSA. Repetir 4 vegades, i al final resuspendre en 5 ml de medi de cultiu amb PSA.
4. Disgregació dels túbuls. Col.locar els túbuls en una placa de petri i tallar amb dos bisturis durant 30 min. fins a obtenir trossos molt petits.
5. Digestió amb Tripsina. Col.locar els túbuls en un *erlenmeyer* amb 45 ml de medi amb PSA, i afegir 5 ml de Tripsina 2.5% i 250 µl de DNAasa, i incubar a 33° C durant 30 min.
6. Aïllament de cèl.lules peritubulars. Passar la mostra a un tub de 50 ml i centrifugar a 800 rpm durant 10 min.. Després de descartar el sobrenadant per eliminar la Tripsina, resuspendre el *pellet* en 50 ml de medi de cultiu amb PSA. Barrejar bé per inversió i deixar sedimentar durant 15 min. Es descarta el *pellet* on hi ha les cèl.lules de Sertoli. Es recull el sobrenadant on hi ha les cèl.lules peritubulars i les cèl.lules germinals. Tot seguit es passa la mostra per un filtre de 100 µm i es centrifuga a 800 rpm durant 10 min., descartant el sobrenadant. Resuspendre el *pellet* en 15 ml de medi amb 10% FBS i PSA. Les cèl.lules peritubulars es posan a créixer en condicions normals a 37° C i 4.5% de CO₂.

II.1.4. Elutriació de cèl.lules germinals

Es van extreure els testicles dels ratolins i es van rentar amb PBS*. Es van aïllar les cèl.lules germinals segons el protocol descrit prèviament. Durant el protocol es van preparar les següents solucions:

- Solució A: PBS 1.25X pH 7.5
- Solució B: 0.65 g Ca Cl₂, 0.5 g Mg Cl₂ i 2.38 g Hepes en 1 l d'aigua pH 7.4

- Solució C: 0.9 g Glucosa, 15 g BSA i 1.98 g Piruvat en 600 ml Solució B
- Solució PBS +: 50 ml Solució B i 600 ml Solució A

L'elutriador és un aparell que consisteix en un rotor que s'adapta a una microcentrifuga i que està connectat a una bomba de succió. Segons la força de succió i la velocitat a la que gira el rotor es van obtenir diferents fraccions de cèl.lules.

Velocitat	Fracció	Succió (ml / min)	Volum (ml)
Elutriador 2000 rpm	A	214	250
	B	260	100
	C	300	100
	D	365	125
Elutriador 0 rpm	post D	410	100

Es van fer unes preparacions ràpides en portaobjectes per tal de confirmar el tipus cel.lular de cadascuna de les fraccions:

- Fracció B: es van obtenir paquetens mitjans i reduccions meiótiques.
- Fracció C: es van obtenir paquetens mitjans, reduccions meiótiques i cèl.lules plurinucleades.
- Fracció D: es van obtenir paquetens grans i moltes reduccions meiótiques.
- Fracció post D: es va obtenir el mateix que la fracció D.

La fracció A es va repartir en 5 tubs de 50 ml que es van centrifugar a 800 rpm durant 10 min. Després de descartar el sobrenadant, es van ajuntar els *pellets* i es van resuspendre junts. Aquesta fracció es va tornar a passar per l'elutriador, però canviant els paràmetres, tant de velocitat com de força de succió de la bomba.

Velocitat	Fracció	Succió (ml / min)	Volum (ml)
Elutriador 2500 rpm	E	128	250
	F	210	100

	G	250	125
	post G	300	100

Els tipus cel.lulars que es van obtenir en les noves fraccions van ser identificats de la mateixa manera:

- Fracció E: no hi havia cèl.lules.
- Fracció F: es van obtenir espermatides rodones.
- Fracció G: no es va poder determinar l'origen cel.lular.
- Fracció post G: es van obtenir paquitens, espermatides allargades i cèl.lules multinucleades.

A partir de les fraccions B i C es van obtenir els paquitens i a partir de la fracció F es van obtenir les espermatides rodones. Aquestes cèl.lules es van utilitzar per dur a terme els co-cultius amb les cèl.lules de Sertoli.

II.1.5. Co-cultius de cèl.lules de Sertoli/paquitens i cèl.lules de Sertoli/espermatides rodones

Primer es van posar a punt les condicions de cultiu de les cèl.lules de Sertoli adultes (3-4 mesos) de ratolí, ja que fins al moment, només s'havia aconseguit cultivar cèl.lules de Sertoli de 21 dies, és a dir d'animals immadurs. Totes les proves prèvies a l'experiment es van realitzar amb cèl.lules de Sertoli de ratolins CD1 de 3 mesos d'edat. En primer lloc, es va intentar cultivar-les directament sobre el pou a tres densitats diferents (0.5×10^6 cèl., 1×10^6 cèl., 2×10^6 cèl.) i dos medis de cultiu diferents (2% FBS i 10% FBS). L'adherència de les cèl.lules de Sertoli a la superfície del pou va ser molt deficient. Per tal de millorar aquest aspecte, es van provar tres tipus de superfícies diferents, que es van provar amb cadascuna de les densitats cel.lulars i tipus de medis anteriors. Les tres superfícies van ser:

1. Cèl.lules peritubulars de rata. Es van cultivar 7 dies, durant aquest temps aquestes cèl.lules van fer la làmina basal per tal d'adherir-se a la superfície del pou. A continuació es van lisar les cèl.lules quedant únicament la làmina basal.

2. Línia cel.lular de peritubulars TRM. Amb aquesta superfície es va seguir el mateix protocol que amb les cèl.lules peritubulars de rata.
3. Matrigel. És una matriu extracel.lular sintètica de composició desconeguda. És la més ràpida d'utilitzar, ja que es líquida. Es van col·locar 100 µl per pou i es va deixar assecat a temperatura ambient.

Les millors condicions en les que van créixer les cèl.lules de Sertoli van ser en la superfície de Matrigel a una densitat cel.lular de 1×10^6 cèl.lules i amb medi de cultiu suplementat amb 2% de FBS. Una vegada decidides les condicions, es va realitzar l'experiment amb les cèl.lules de Sertoli extretes de dos ratolins transgènics i les cèl.lules de Sertoli de dos ratolins no transgènics de la mateixa ventrada, com a controls. Es van fer les dues extraccions per separat i les cèl.lules de Sertoli obtingudes es van cultivar durant dos dies en les condicions ja descrites. Es van omplir 66 pous amb cèl.lules de Sertoli transgèniques i 66 pous amb cèl.lules de Sertoli no transgèniques. Als dos dies de cultiu, es van sacrificar 11 ratolins CD1 de 3 mesos d'edat, als quals se'ls van extreure les cèl.lules germinals. Les cèl.lules germinals es van passar per l'elutriador, per tal d'obtenir les diferents fraccions. Es van aïllar les poblacions de paquitens i espermàtides rodones per tal de realitzar els co-cultius. Així, es van afegir a 22 pous tant de cèl.lules de Sertoli transgèniques com no transgèniques 300.000 cèl.lules en paquitè, i igualment amb les espermàtides rodones, quedant 22 pous de Sertoli transgèniques i no transgèniques soles. Les cèl.lules es van poder co-cultivar durant 5 dies. En els dies 1, 3 i 5 es van rascar 6 pous de cada condició per tal d'extreure el mRNA.

II.1.6. Transfeccions

Es van realitzar transfeccions estables i transitòries en cèl.lules CHO, utilitzant el protocol *LipofectAMINE PLUS Reagent* (Gibco-BRL). Les cèl.lules a les que es va realitzar la transfecció estable se les va cultivar amb medi que contenia Geneticina (G418) per tal de seleccionar només les que haguessin incorporat el plàsmid, ja que aquest conté resistència pel tòxic. Van ser transfectades de manera estable amb plàsmids d'expressió que contenien, la SHBG/ABP de rata i la SHBG/ABP de ratolí. D'altra banda es va fer una transfecció

estable i una transitòria amb el plàsmid pCDNA 3.1 que contenia un cDNA obtingut a partir de les línies cel.lulars de càncer de pròstata PC3 i LNCaP. El protocol va consistir en:

1. El dia abans de la transfecció tripsinitzar les cèl.lules i sembrar per que al dia següent estiguin entre un 50 i 75 % de confluència.
2. A l'endemà, per cada una de les transfeccions preperar 4 tubs, dos tubs amb 800 µl de medi sense sèrum als quals se'ls afegeix 25 µl de *LipofectAMINE*. I dos tubs amb 800 µl de medi sense sèrum a un dels quals se li afegeix el DNA plasmídic (9.6 µg) i 25 µl de *Reagent PLUS*, i a l'altre només el *Reagent PLUS*. Barrejar els dos tubs i deixar a temperatura ambient durant 30 min.
3. A continuació agafar les cèl.lules i treure el medi, afegint medi nou però sense sèrum que conté els aproximadament 1.6 ml amb el DNA plasmídic i la *LipofectAMINE*. Incubar a 37° C i 4% de CO₂ durant 5 h.
4. Tot seguit afegir igual volum de medi que conté un 20% de FBS per tal de deixar-les tota la nit amb medi al 10% FBS. A l'endemà ja es pot començar la selecció per les transfeccions estables i el cultiu amb medi sense sèrum de la transfecció transitoria.

II.1.7. Mesura de l'índex de DNA per citometria de flux

El DNA cel.lular va ser tractat amb ribonucleasa A (*RNase*; 0.1 mg/ml; Roche Molecular Biochemicals) a 37 ° C durant 30 min., i marcat amb iodur de propidi (IP; Sigma, St. Louis, MO) a 100 µg /ml, i guardats a 4°C, per ser analitzades 12 hores després (Mys-Hoopes, L.L. et al. 1995). Una part de cada mostra va ser tractada igual però sense la incubació amb *RNasa* i analitzada simultàniament. La fluorescència va ser recollida utilitzant un citometre de flux EPICS XL (Coulter Corp., Hialeah, FL) equipat amb un laser d'argó a 488 nm. La fluorescència vermella (620 nm) del IP i la dispersió de la llum (*light scatter*) van ser mesurats de forma simultània i enfrontats en una gràfica. Els agregats de cèl.lules van ser eliminats definint una finestra de pas del tamany equivalent a una cèl.lula. L'anàlisi de DNA en histogrames de fluorescència van ser realitzats utilitzant el *software* de

Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). Un mínim de 12000 cèl.lules van ser analitzades per mostra.

II.1.8. Concentració del medi de cultiu

Per tal de concentrar el medi de les cèl.lules es van fer servir les columnes *Ultrafree-15 centrifugal filter device* (Millipore Corporation, Bedford, MA). Es va tractar únicament d'afegir els 10 o 15 ml de medi de les cèl.lules a les columnes i centrifugar 15 min. a 2500 rpm, obtenint-se un volum final de 1 ml.

II.2. Tècniques de biologia molecular

II.2.1. Extracció de DNA genòmic de baix pes molecular

El DNA genòmic de baix pes molecular de dos ratolins transgènics per la SHBG/ABP de rata i dos ratolins no transgènics de la mateixa ventrada, de 6 mesos d'edat, va ser extret utilitzant el *Apoptotic DNA ladder kit* (Roche Molecular Biochemicals) seguint les instruccions del *kit*. Es van córrer 0.5 µg de DNA de baix pes molecular de totes quatre mostres i un marcador de pes molecular de 100 pb en un gel d'agarosa al 1.8% amb bromur d'etidi, que va ser visualitzat en un transil.luminador d'UV, i capturat amb el Sistema de Gel Doc fent servir el *software* de Molecular Analyst/Macintosh (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

II.2.2. Extracció de RNA

Es va extreure RNA total i mRNA. El mRNA es va extreure quan es disposava de poca quantitat de mostra.

En el cas dels ratolins transgènics per la SHBG/ABP de rata es va extreure mRNA, ja que es van utilitzar els mateixos animals que van ser utilitzats pels estudis morfològics i anàlisi de TUNEL. També es va extreure el mRNA de cèl.lules de Sertoli aïllades de ratolins transgènics per la SHBG/ABP de rata, concretament, 2 ratolins homozigots, 5 ratolins heterozigots i 3 ratolins normals. Pel que fa a l'extracció de mRNA a partir de cèl.lules germinals aïllades, aquestes provenien de 3 ratolins homozigots, 3 heterozigots i 3 controls no transgènics. Aquesta extracció de mRNA es va realitzar utilitzant el *Quickprep mRNA*

purification kit (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Es va fer servir el mateix protocol per extreure mRNA de les línies cel.lulars de pròstata, teixits de prostata, testicle, epidídim i vesícula seminal humana. El protocol consisteix en els següents punts:

1. Triturar les mostres provinents dels teixits amb nitrogen líquid i un morter fins a reduir-ho a pols. Afegir 400 µl de *Extraction Buffer* a la pols del teixit i als *pellets* de les cèl.lules i pipetejar bé per tal d'acabar de trencar les cèl.lules. Afegir 800 µl de *Elution Buffer*, i barrejar per inversió.
2. Posar 1 ml d'*Oligo dT Solution* per cada una de les mostres. Tant aquests tubs com els que contenen les mostres es van centrifugar a 12000 rpm durant 1 min. Descartar el sobrenadant del tub amb *Oligo dT* i a aquest *pellet* d'*Oligo dT* afegir-li 1 ml de la mostra. Barrejar els tubs per agitació durant 5 min. i centrifugar a 12000 rpm durant 1 min.
3. Rentats amb *High Salt Buffer*. Barrejar bé i centrifugar a 12000 rpm durant 1 min., descartar el sobrenadant i afegir 1 ml de *High Salt Buffer*, barrejar bé per inversió els tubs durant 3 min. i tornar a centrifugar a 12000 rpm durant 1 min. Repetir 5 cops.
4. Rentats amb *Low Salt Buffer*. Afegir 1 ml de *Low Salt Buffer*, barrejar bé per inversió els tubs durant 3 min. i centrifugar a 12000 rpm durant 1 min. Repetir 2 cops. Resuspendre en 300 µl de *Low Salt Buffer* i passar a les columnes del *kit*.
5. Fer 2 rentats més amb 500 µl de *Low Salt Buffer* descartant el líquid del tub col.lector.
6. Eluir els mRNAs amb 400 µl de *Elution Buffer* escalfat previament a 65° C.
7. Precipitar els mRNAs afegint 10 µl de glicogen, 40 µl d'acetat potàssic i 1ml d'etanol absolut fred a -20° C durant tota la nit. A l'endemà centrifugar a 12000 rpm durant 30 min., descartar el sobrenadant, i eluir en 100 µl H₂O DEPC.

En el cas dels ratolins transgènics per la SHBG/ABP humana es va extreure RNA total a partir de cèl.lules de Sertoli aïllades (de 3 controls, 3 heterozigots shbg11, i 2 heterozigots shbg4), cèl.lules germinals aïllades (*pool* de 6 ratolins heterozigots shbg11, *pool* de 6 ratolins heterozigots shbg4), cèl.lules germinals més espermatozous aïllades (*pool* de 3 ratolins heterozigots shbg11), i de teixits com el ronyó, el fetge, el teixit adipós, el cervell i l'epidídim (ratolins no transgènics i ratolins heterozigots shbg11).

Per tal d'extreure aquest RNA total es va fer servir el Trizol (Gibco-BRL). El protocol va consistir de manera breu en :

1. Afegir a la mostra 1 ml de Trizol. En el cas dels teixits disgregar la mostra amb el politron. Vòrtex de totes les mostres durant 5 min. Centrifugar a 12000 rpm durant 5 min.
2. Agafar 1 ml del sobrendant i posar en un tub nou amb 200 µl de cloroform. Barrejar bé per inversió durant 2 min. i centrifugar a 12000 rpm durant 10 min.
3. Col·locar la fase aquosa en un altre tub que contingui 500 µl d'isopropanol. Precipitar a 4° C durant 10 min. i centrifugar a 12000 rpm durant 15 min.
4. Descartar el sobrenadant i rentar el *pellet* amb 1 ml d'etanol 70%. Centrifugar a 12000 rpm durant 15 min. i descartar el sobrenadant. Resuspendre el *pellet* en 200µl H₂O DEPC.

Pel que fa a les mostres dels pacients amb càncer de pròstata es va fer servir el *kit* de *RNeasy Midi / Maxi* (QIAGEN). Aquest protocol va consistir en:

1. Homogenització del teixit. Col·locar en 4 ml de *Buffer RLT* entre 130 –250 mg de mostra i homogenitzar amb el politron.
2. Centrifugar les mostres a 3000 rpm durant 10 min., descartar el *pellet*.

3. Afegir al sobrenadant 4 ml d'etanol 70° a cada mostra i barrejar vigorosament.
4. Col·locar les mostres a les columnes i centrifugar a 3000 rpm durant 5 min.
5. Rentar la columna amb 15 ml del *Buffer RW1* centrifugant a 3000 rpm durant 5 min.
6. Afegir 2.5 ml del *Buffer RPE* i centrifugar a 3000 rpm durant 2 min. Repetir un cop més.
7. Eluir els RNAs totals en 200 µl d'aigua *RNase-free* del kit.

II.2.3. Expressió per RT-PCR

Utilitzant 200 U de transcriptasa inversa Superscript II H (Life Technologies) 0.25 ng de mRNA van ser transcrits inversament en un volum final de 20 µl en presència de 25 µg/ml d'*Oligo dT*₁₅ (deoxitimidina), *first strain Buffer* (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl i 3 mM MgCl₂), 0.01 M DTT i 1 mM de cada un dels dATP, dCTP, dGTP i dTTP. El mRNA i l'*Oligo dT* van ser barrejats i escalfats a 70° C durant 10 min., refredats a 4° C, i es van afegir els altres reactius. La transcripció inversa es va realitzar a 42° C durant 50 min. Un microlitre del DNA complementari (cDNA) resultant va ser amplificat en un volum final de reacció de 50 µl en presència de 2 U de Taq polimerasa (Ecogen, Barcelona, Spain), 0.05 mM MgCl₂, 0.2 mM de cadascun dels dNTPs i 0.1 µM dels *primers* específics (Anex I). Es va escollir el mRNA de la ciclofilina A (CypA) com a control de l'expressió. L'amplificació es va fer amb un termociclador (model 2400, Perkin-Elmer Corporation, Perkin Elmer Applied Bioystems, Foster City, CA). El programa va ser:

1. Desnaturalització: 94° C durant 3min.
2. Cicle d'amplificació: 94° C durant 15 seg., la temperatura d'*annealing* va variar entre 54° C i 65° C durant 30 seg., i l'extensió es va fer a 72° C durant 45 seg. El número de cicles va oscilar entre 30 i 45 segons el gen a amplificar (Anex).
3. Extensió final: a 72° C durant 10 min.

Els productes de la PCR van ser separats en gels d'agarosa del 1.8% i quantificats amb el *software* de Molecular Analyst/Macintosh (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

II.2.4. Especificitat dels *primers* de SHBG/ABP de rata i ratolí

El producte amplificat amb els *primers* de SHBG/ABP de rata (rABP) va ser de 954 pb, mentre que el producte amplificat amb els *primers* de SHBG/ABP de ratolí (mABP) va ser de 955 pb. Els productes de l'amplificació van ser purificats utilitzant el *QIAquick PCR Purification Kit* (Quiagen, Hilden, Germany). Els productes purificats van ser digerits amb dos enzims de restricció, un específic per la SHBG/ABP de rata (AccI) i l'altre per la SHBG/ABP de ratolí (HhaI). El volum final de digestió va ser de 50 µl, a 45 µl del producte purificat de PCR se li van afegir 5 µl del *Buffer* 10X de cada un dels enzims i 1 µl de l'enzim a 37° C durant 1 h. Tot seguit es va afegir 1 µl més d'enzim i es van deixar a 37° C durant tota la nit. Els fragments de la digestió van ser separats en gels d'agarosa del 2%. A més a més, productes de PCR purificats amb cada una de les dues parelles de *primers* van ser seqüenciats utilitzant un analitzador genètic ABI Prism 310 (Perkin-Elmer Corp.).

II.2.5. Expressió diferencial

La tècnica de *Differential Display* permet identificar i separar els cDNAs que estan diferencialment expressats entre dues condicions (Liang and Pardee, 92). La tècnica es basa en l'extracció dels mRNAs de les dues condicions, la retrotranscripció dels mateixos i la seva posterior amplificació a baixa estringència amb un *primer* escollit a l'atzar i un *Oligo dT*. Aquesta amplificació donarà lloc a un conjunt de bandes de cDNA de molts tamanys diferents. La seva separació en un gel desnaturalitzant permet identificar la diferència d'expressió d'alguna d'aquestes bandes de cDNA, ja sigui per un augment d'expressió o una disminució. El conjunt de cDNAs obtinguts dependrà del *primer* escollit, així que l'atzar juga un paper important en aquesta tècnica.

Per tal d'aïllar el mRNA es fa servir el *Quickprep mRNA purification kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL). Per realitzar l'anàlisi de l'expressió diferencial es va utilitzar el *mRNA Differential Display System kit* (GenHunter, Nashville, USA). Per la

retrotranscripció es van fer servir 0.02 µg d'mRNA, tampó per l'enzim, barreja de dNTPs (20 µM), *Oligo dT*₁₅ (0.1 µM) i l'enzim MMLV transcriptasa inversa (5 U/µl). Es van escalfar tots els components a 65° C durant 5 min., excepte l'enzim, tot seguit a 37° C durant 10 min., i a 4° C durant 2min., es va posar l'enzim i la reacció es va dur a terme a 37° C durant 50 min., per acabar aturant la reacció a 75° C durant 5 min..

La PCR es va fer a partir de 2 µl del producte de la RT, amb el tampó de PCR, dNTPs (2 µM), *Oligo dT* i un *primer* aleatori proporcionat pel *kit* (0.2 µM), ³³P dATP, i 0.1 U/µl d'AmpliTaQ (Perkin-Elmer). Les condicions de d'amplificació van ser, 94° C durant 3min.; 40 cicles a 94° C durant 30seg., 40° C durant 2 min., 72° C durant 30seg.; i a 72° C durant 5 min..

Es va preparar un gel de poliacrilamida al 6% + 7M urea en el qual es van separar per electroforesi 3 µl de cada una de les mostres barrejades amb 2 µl de tampó de càrrega prèviament escalfades a 80° C a 1400 V. El gel resultant es va assecar fent servir l'assecador de gels a 80° C durant 1-2h. Un *film* va ser exposat durant 12h i es va revelar.

Un cop revelat el *film*, es van seleccionar les bandes que presentaven una expressió diferencial més gran i es van retallar del gel assecat. Les bandes retallades es van diluir en 50 µl d'aigua destil.lada a 65° C durant 2h. Després es van precipitar amb acetat sòdic (0.3M), glicogen i etanol absolut fred, a -20 ° C durant 24h. Les mostres es van centrifugar a 12000 rpm durant 30min., el *pellet* es va resuspendre en 10 µl d'aigua destil.lada. Per tal de fer les reamplificacions, es va partir de 4 µl de cada mostra, en un volum final de 50 µl on hi havia tampó de PCR, dNTPs (20 µM), *Oligo dT* (0.2µM), el *primer* aleatori (0.2 µM), i 0.1 U/µl d'AmpliTaQ (Perkin-Elmer). Les condicions de la reamplificació són les mateixes que les de l'amplificació anterior.

II.2.6. Purificació del producte de PCR

Aquesta purificació es va fer amb el *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany). Aquest protocol va consistir en:

1. Afegir 5 volums del *Buffer PB* al volum de reacció de la PCR. És a dir, si el volum va ser de 50 µl es van afegir 250 µl de PB.

2. Col·locar tot el volum ben barrejat en la columna de purificació del *kit*, centrifugant a 12000 rpm durant 1 min.
3. Descartar el líquid del tub recol·lector i afegir 750 µl del *Buffer PE*, centrifugant a 12000 rpm durant 1 min.
4. Centrifugar un altre cop a 12000 rpm durant 1 min. per buidar bé la columna de líquid de rentat i afegir 50 µl d'H₂O pH 8.5 per eluir, centrifugant a 12000 rpm durant 1 min.

II.2.7. Purificació de banda del gel d'agarosa

L'extracció de banda del gel d'agarosa es va fer amb el *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Es va procedir a:

1. Peser el tros de gel que contenia la banda a purificar. Col·locar en un tub i afegir 3 volums de *Buffer QG* per cada volum de gel (100 mg ~ 100 µl).
2. Incubar les mostres a 50° C durant 10 min. fent vortex cada 2-3 min., durant aquesta incubació el gel d'agarosa es va dissoldre.
3. Afegir un volum (respecte els mg de mostra) d'Isopropanol. Barrejar bé per inversió i col·locar a la columna. Centrifugant 1 min. a 12000 rpm.
4. Descartar el líquid i afegir a la columna 500 µl més de *Buffer QG*. Centrifugar les mostres a 12000 rpm durant 1 min.
5. Descartar el líquid i rentar amb 750 µl de *Buffer PE*, deixar 5 min. a temperatura ambient, centrifugant a 12000 rpm durant 1 min.
6. Centrifugar una segona vegada i eluir amb 50 µl d'H₂O pH 8.5.

II.2.8. Extracció ràpida de DNA plasmídic de bacteri

Aquesta extracció ràpida de DNA plasmídic de bacteri, es va realitzar amb els cultius crescuts de bacteris que havien estat transformats amb plàsmids que contenien diferents inserts. Això es va fer per tal de fer *Minipreps* exclusivament del cultiu que interessaven. El protocol va consistir en:

1. Agafar 50 µl del cultiu crescut i centrifugar a 12000 rpm durant 10 min. Descartar el sobrenadant.
2. Eluir el *pellet* de bacteris en 50 µl d'H₂O i bullir durant 5 min.
3. Centrifugar a 12000 rpm durant 10 min, passar el sobrenadant a un tub nou.

Aquest sobrenadant contenia DNA plasmídic dels bacteris i es va utilitzar per realitzar una PCR amb *primers* M13 específics del vector, així es va conèixer el tamany de l'insert que contenia cadascun del cultius.

II.2.9. Extracció de DNA plasmídic de bacteri

L'extracció de DNA plasmídic de bacteri a petita escala es va fer utilitzant el *WIZARD PLUS SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), que va consistir en:

1. A partir de 3 ml del cultiu crescut fer un *pellet* de bacteris, centrifugar a 12000 rpm durant 10 min. Descartar el sobrenadant.
2. Resuspendre el *pellet* afegint 250 µl de *Cell Resuspension Buffer* i utilitzar el vortex.
3. Afegir 250 µl de *Cell Lysis Buffer*, invertir els tubs 5 cops i deixar-los reposar a temperatura ambient durant 5 min.
4. Afegir 10 µl de *Alkaline Protease Solution*, invertir els tubs 5 cops i deixar-los reposar a temperatura ambient durant 5 min.

5. Afegir 350 μ l de *Cell Neutralization Buffer*, invertir els tubs 5 cops i centrifugar a 12000 rpm durant 10 min.
6. Col·locar els 850 μ l de sobrenadant a la columna de purificació del *kit*. Centrifugar a 12000 rpm durant 1 min. Descartar el líquid del tub col·lector.
7. Fer dos rentats amb el *Wash Buffer*, el primer de 750 μ l i el segon de 250 μ l. Centrifugar el tubs a 12000 rpm durant 2min., per tal d'acabar d'eliminar tot el *Wash Buffer*.
8. Eluir els DNAs plasmídics de les columnes amb 50 μ l d'aigua estèril del *kit* centrifugant a 12000 rpm durant 1 min.

II.2.10. Purificació de la fracció d'IgGs del sèrum

Es va purificar la fracció d'IgGs del sèrum de conills immunitzats amb la proteïna de la SHBG/ABP humana. El protocol va consistir en:

1. Rentar un cop la columna de sefarosa amb el *Buffer* 100 mM Tris-HCl pH 8 i 150 mM NaCl.
2. Passar per la columna 1 ml de Proteïna A, i tot seguit rentar amb 1 ml del *Buffer* anterior de pH 8.
3. Barrejar 1 ml de sèrum del conill i 1 ml del *Buffer* pH 8 i passar-los per la columna.
4. Rentar la columna amb un total de 20 ml del *Buffer* pH 8.
5. Eluir la fracció d'IgG que ha quedat a la columna passant una solució d'àcid cítric i Citart Na₃ a pH 4. Es van recollir 7 al·liques en tubs que contenien 200 μ l de Tris-HCl 1M pH 9 per tal de neutralitzar el més aviat possible la solució on es recollia l'anticòs.

II.2.11. Purificació de l'anticòs anti-SHBG/ABP humana de sèrum immune de conill

Es van fer servir unes columnes de 1 ml *HiTrap NHS-activated*. Primer de tot es van fer els *Buffers* necessaris per al protocol. Van consistir en:

- *Buffer A*: 0.5 M etanolamina, 0.5 M NaCl pH 8.3
- *Buffer B*: 0.1 M acetat, 0.5 M pH 4
- *Buffer C*: 1 mM HCl
- *Buffer D*: 0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3
- *Buffer E*: 0.2 M àcid acètic pH 2.5

El protocol va consistir en:

1. Obrir la columna i posar una gota del *Buffer C* fred per tal d'eliminar les bombolles. Rentar la columna 3 cops amb 2 ml del *Buffer C* fred.
2. Diluir la proteïna SHBG/ABP humana purificada en el *Buffer D*, i incubar a temperatura ambient durant 30 min. Rentar 3 cops amb amb 2 ml del *Buffer C* fred.
3. Barrejar 0.5 ml de sèrum de conill amb 0.5 ml del *Buffer D*, i incubar a la columna a temperatura ambient durant durant 30min.
4. Rentats que consisteixen en:
 - 3 cops 2 ml *Buffer A*
 - 3 cops 2 ml *Buffer B*
 - 3 cops 2 ml *Buffer A*
 - Deixar la columna a temperatura ambient durant 30 min.
 - 3 cops 2 ml *Buffer B*
 - 3 cops 2 ml *Buffer A*
 - 3 cops 2 ml *Buffer B*

5. Eluir l'anticòs amb 2 ml del *Buffer E*, i recollir aliquotes de 0.5 ml en 100 μ l de 1 M Tris-HCl pH 9.
6. Dialitzar els 500 μ l d'anticòs purificat barrejats amb 500 μ l del *Buffer D* que conté 10 μ M de DHT.

II.2.12. Clonatge

Es van clonar els productes de PCR i les bandes purificades a partir de gel d'agarosa i de gel de poliacrilamida (*Differential Display*). La clonació es va dur a terme utilitzant el *TOPO TA Cloning Version K2* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). El protocol va ser el següent:

1. Reacció de clonació. Afegir de 0.5 a 4 μ l del producte a clonar, 1 μ l de *Salt Solution*, aigua fins a un volum de 5 μ l i 1 μ l de *TOPO vector* [conté el vector pCR 2.1- TOPO (que té el ORF per resistència a ampicil.lina) i la lligasa] a temperatura ambient durant 5 min.
2. Preparació de les cèl.lules, que són *E. coli* TOP10 que no necessiten IPTG per la selecció blau/blanc. Afegir 2 μ l de la reacció de lligació a les cèl.lules i deixar en gel durant 30min.
3. Transformació de les cèl.lules. Incubar les cèl.lules a 42° C durant 3 seg., tot seguit posar-les en gel durant 2 min. Afegir 250 μ l de medi SOC i posar a créixer a 225 rpm i a 37° C durant 1 h.
4. Sembra de les cèl.lules. Dels 300 μ l que hi ha al tub sembrar 75 μ l en una placa d'agar amb ampicil.lina i X-Gal. Posar a créixer les plaques a 37° C durant tota la nit.

II.2.13. Northern Blot

Els RNAs (total i missatger) van ser separats en un gel d'agarosa al 1.5% desnaturalitzant que contenia formaldehid. Els RNAs van ser transferits a unes membranes

de *Nylon* per capil·laritat. Els RNA van ser fixats a la membrana per radiació ultraviolada (UV Stratalinker 1800, Stratagen). Les diferents sondes utilitzades eren productes de PCR purificats, bé amb el *QIAquick PCR Purification Kit* o bé, amb el *QIAquick Gel Extraction Kit*. Les sondes van ser marcades amb ^{32}P dCTP mitjançant el *Random Primer kit* (Promega, Madison, WI). Les membranes van ser hibridades amb les sondes en una solució que contenia formamida a 42° C durant tota la nit. Després de diferents rentats amb solucions que contenien concentracions decreixents de SSC i SDS. Les membranes van ser exposades a films d'autoradiografia, que un cop revelats, van ser escanejats i analitzats utilitzant el *software* de Molecular Analyst/Macintosh (Bio-rad Laboratories).

II.2.14. *Western Blot*

L'extracció de proteïna es va realitzar digerint els teixits amb *RIPA Buffer* [50 mM Tris-HCl pH 7.7; 150 mM NaCl; 0.8% Tritó X-100; 0.8% Deoxicolat Sòdic; 0.08% SDS; 10 mM Tetraacetat d'etilendiamina; 100 μM Na_3VO_4 ; 50 mM NaF; 0.3 mM fenilmetilsulfonilfloride; 5 mM àcid iodoacètic] a 4° C durant 12 h. Els homogenats van ser centrifugats a 12000 rpm durant 10 min., descartant el *pellet*. Les concentracions de proteïna de les mostres van ser mesurades utilitzant el *Bio-Rad Dc Protein assay* (Bio-Rad Laboratories). Per realitzar el *Western Blot* es van seguir els següents passos:

1. Electroforesi. 50 μg de proteïna de totes les mostres es van escalfar a 95° C durant 10 min. i es van carregar en un gel al 10% SDS-poliacrilamida i van ser separades sota condicions reductores aproximadament a 40-50 mA durant 2h.
2. Transferència. Tot seguit les proteïnes van ser transferides del gel de poliactilamida a una membrana de PVDF (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) a 400 mA durant 1h 15 min.
3. Bloqueig d'unions inespecífiques. La membrana va ser incubada en una solució de bloqueig que va consistir en 5% de llet, 0.01% Tween-20 en PBS, a temperatura ambient i en agitació durant 2 h.

4. Incubació amb l'anticòs primari. La membrana va ser incubada en la mateixa solució de bloqueig però que contenia un anticòs policlonal de cabra contra el receptor d'estrogèns beta de ratolí (mER) (3 µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology) a 4° C durant tota la nit.
5. Rentats. Després d'atemperar la membrana a temperatura ambient durant 1h es van fer tres rentats amb 0.01% Tween-20 en PBS a temperatura ambient i en agitació de 15 min. cadascun.
6. Incubació amb l'anticòs secundari. Les membranes van ser incubades amb la solució de bloqueig que aquest cop contenia l'anticòs secundari, que era un anticòs policlonal de cavall HRP contra cabra (1/2000) a temperatura ambient i en agitació durant 1 h.
7. Rentats. Es van fer tres rentats amb 0.01% Tween-20 en a temperatura ambient i en agitació de 15 min. cadascun.
8. Detecció del marcatge. Les bandes immunoreactives es van visualitzar amb el *Enhanced Chemiluminescence* (ECL kit, Amersham Pharmacia Biotech).
9. Quantificació. El film que va ser escanejat i analitzat utilitzant el sistema d'anàlisi d'imatge de Bio-rad.

II.2.15. Fluoroimmunoassaig a temps de resolució (DELFIÀ)

Aquesta tècnica és un fluoroimmunoassaig a temps de resolució (DELFIÀ). Aquests assajos utilitzen com a marcadors un metall lantànid quelant, que és l'Europi. Aquest metall té unes propietats fluorescentes úniques. Un cop s'ha produït l'immunoreacció i s'afageix la solució intensificadora (*Enhancement Solution*), el quelat es dissocia i l'ió d'Europi forma un nou quelat amb els components de la *Enhancement Solution* dins d'una micel·la protectora. Protegit per les molècules d'aigua, aquest nou quelat resulta altament fluorescent (la fluorescència de l'europi és multiplicada per un milió de cops).

Aquest mètode s'utilitza per a detectar proteïnes en forma nativa en extractes protèics. Es va realitzar amb extractes protèics que provenien de cèl·lules de Sertoli i

germinals aïllades tant de ratolins controls, com ratolins transgènics de la línia shbg11 i de la línia shbg4, així com d'epidídim de ratolí control i transgènic shbg11, i de medi concentrat i extracte proteïc provinent de cèl.lules PC3 i PZHPV7. Per tal de dur a terme aquest protocol es van necessitar dos reactius comercials, DELFIA *Assay Buffer* i DELFIA *Enhancement Solution* (Wallac Oy, Turku, Finland). El protocol va consistir en:

1. Preparació de les mostres. En una placa de 96 pous posar 100 µl de la fracció d'IgG purificada a partir del sèrum de conill immunitzat amb proteïna SHBG/ABP humana. Diluir 1/50 la fracció d'IgG en el *Buffer* que consisteix en 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl. Incubar a 4° C durant tota la nit.
2. Bloqueig d'unions inespecífiques. Treure la fracció d'IgG dels pous i afegir 300 µl de 1 % BSA en 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl. Incubar a temperatura ambient durant 3-4h.
3. Rentats. Rentar 3 cops els pous amb 300 µl de *Wash Buffer* (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.01% Tween-20).
4. Incubació de l'extracte proteïc. Es va diluir cada una de les mostres a la mateixa concentració amb el *Buffer* 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, posar 100 µl de l'extracte proteïc a cada pou, incubant-los a 4° C durant tota la nit.
5. Rentats. Rentar 3 cops els pous amb 300 µl de *Wash Buffer* (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.01% Tween-20).
6. Detecció. Incubar amb un anticòs *European Labeled* diluit en el *Assay Buffer* 1/500, posant 100 µl a cada pou, i incubant-ho a temperatura ambient durant 2 h.
7. Rentats. Rentar 3 cops els pous amb 300 µl de *Wash Buffer* (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.01% Tween-20).

8. Afegir 100 µl de la *Enhancement Solution* a cada pou i deixar a temperatura ambient durant 10 min.

II.2.16. Seqüenciació

Les reaccions de seqüència van ser fetes amb el *DNA Sequencing Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Warrington, UK).

- Reacció de seqüència. Es va partir de 900 ng de plàsmid (provinent de miniprep), 1 µl de primer (5 pmols/µl), 4 µl de BigDye i es va afegir H₂O fins a 20 µl de volum final. El programa standard utilitzat va ser: 94° C durant 3 min.; 25 cicles a 96° C durant 10seg., 50° C durant 5seg., 60° C durant 4min.
- Precipitació de la seqüència. Als 20 µl de la reacció se li van afegir 16 µl d' H₂O i 64 µl d'etanol 95°, i es va deixar reposar a temperatura ambient durant 10 min.. Tot seguit es van centrifugar a 12000 rpm durant 20 min. Es va rentar el *pellet* amb etanol 70° i es va assecar a 37° C durant una mitja hora.

Els *primers* més utilitzats per a la seqüenciació van ser:

<i>Primer</i>	<i>Seqüència</i>	<i>Annealing</i>
M13 <i>Forward</i>	GGTTTCCCAGTCACGAC	50°
M13 <i>Reverse</i>	CAGGAAACA GCT ATGAC	50°
T7	TAAAACCCTCACTAAAG	55°
T3	ATTAACCCTCACTAAAG	45°

II.3. Tècniques en histologia

II.3.1. Histologia i TUNEL

En la línia de ratolins transgènics per la SHBG/ABP de rata es van fer servir un total de 15 ratolins controls i 17 ratolins transgènics. Pels estudis morfològics els ratolins control van consistir en 6 ratolins CD1 (3 ratolins de 3 mesos i 3 de 6 mesos), 6 ratolins C57BL/6

(3 ratolins de 3 mesos i 3 de 6 mesos) i 3 ratolins no transgènics (3 mesos d'edat). Els ratolins transgènics inclouen 7 homozigots (3 de 3 mesos, 3 de 6 mesos i 1 de 12 mesos) i 10 ratolins heterozigots (3 dels quals tenien 3 mesos i 7 de 6 mesos).

Els testicles van ser fixats en paraformaldehid 4% (PF4%) durant 24 hores i inclosos en parafina. Seccions seriades de 5 µm van ser utilitzades per l'estudi de la morfologia després de tenyir-les amb Hematoxilina-Eosina (H&E), i per realitzar la tècnica del TUNEL o marcatge dels extrems 3' lliures del DNA fragmentat de les cèl·lules que pateixen apoptosi.

Aquesta tècnica de TUNEL es va realitzar d'acord amb el protocol original (Gavrieli, Y. et al. 1992) però amb algunes modificacions:

1. Desparafinització i rehidratació. Les seccions van ser desparafinades amb rentats en Xilè (3 vegades, 15 min. cadascuna), i rehidratades amb concentracions decreixents d'etanol.
2. Permeabilització de membranes. Es van incubar les seccions amb 20 µg/ml de Proteïnasa K en PBS, a temperatura ambient durant 15 min.
3. Bloqueig activitat peroxidasa endògena. Es va fer incubant les seccions en peròxid d'hidrogen al 3% en aigua destil·lada.
4. Marcatge. Després de rentar les seccions en aigua destil·lada, van ser incubades amb el *Buffer* de la terminal deoxinucleotidiltransferasa o TdT (25 nM Tris-HCl pH 6.6, 200 mM àcid cacodílic i 200 mM KCl) a temperatura ambient durant 15 min. Posteriorment amb 0.05 U/µl de TdT (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) i 0.5 nM de biotina-16-deoxy (d)-UTP (Roche Molecular Biochemicals) en el *Buffer* de la TdT a 37° C durant 90 min.
5. Parada del marcatge. Es van incubar posteriorment les seccions amb 300 mM NaCl i 30 mM de citrat sòdic a temperatura ambient durant 15 min.

6. Rentats. Les seccions van ser rentades en aigua destil·lada i incubades en 2% de BSA durant 10 min., i rentades en aigua destil·lada i PBS.
7. Detecció del marcatge. Finalment les seccions van ser incubades amb el complexe avidina-biotina (ABC, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), diluït 1:25, a 37 ° C durant 45 min., i la reacció de la peroxidasa va ser visualitzada amb diaminobenzidina i peròxid d'hidrogen.
8. Quantificació. Va ser realitzada mitjançant el comptatge de cèl·lules individuals marcades com a mínim en tres seccions per mostra. Per tal de conèixer la quantitat total de cèl·lules marcades per testicle i la distribució de les cèl·lules positives, es van analitzar dos paràmetres diferents, per una banda el número de cèl·lules marcades per túbul marcat, i per l'altra el número de túbuls marcats per número total de túbuls analitzats.

Les fotografies de les seccions d'H&E i TUNEL van ser fetes amb microscopi Olympus BX50 equipat amb una càmera digital i analitzades utilitzant el *software* C-2.1 W95E. Després van ser escanejades amb el Scan-MakerIII (Microtek) amb una resolució de 300 dpi. La composició de les imatges es va portar a terme amb el Photoshop IV (ADOBE) i van ser impreses amb una impressora FUJIX pictography 3000.

II.3.2. Immunohistoquímica

Pels estudis d'immunohistoquímica en la línia de ratolins transgènics per la SHBG/ABP de rata es van utilitzar seccions de testicle de 6 ratolins no transgènics, 6 ratolins heterozigots i 6 ratolins homozigots. Es van utilitzar diferents anticossos, un policlonal de conill contra la regió amino terminal de l'AR de ratolí (sc-816, Santa Cruz Biotechnology), un policlonal de conill contra la regió carboxi terminal de l'ER de ratolí (sc-542, Santa Cruz Biotechnology), un policlonal de cabra contra la regió amino terminal de l'ER de ratolí (sc-6821, Santa Cruz Biotechnology) i un policlonal de conill contra els residus aminoacídics 55-70 de l'ER de ratolí (PA1-311, Affinity Bioreagents Inc., Golden, CO).

Pel que fa a la línia de ratolins transgènics per la SHBG/ABP humana les immunohistoquímiques es van realitzar en seccions de testicle de 3 ratolins no transgènics, 3 ratolins transgènics shbg11, 3 ratolins transgènics shgb4. Així com en extensions d'espermatozous provinents de ratolins transgènics shbg11 i shbg4 i epidídim de ratolins transgènics shbg11. Es va utilitzar un anticòs policlonal de conill contra la SHBG/ABP humana.

En les immunohistoquímiques en les que l'anticòs primari era de conill, es va utilitzar el sistema *EnVision-Plus-HRP System* (Dako Corporation, Carpinteria, CA) seguint les instruccions de la casa comercial. El protocol utilitzat va ser el següent:

1. Desparafinització i rehidratació. Les seccions es van desparafinar amb xilens (3 vegades, 15 min. cadascuna) i es van rehidratar amb concentracions decreixents d'etanol (2 vegades, 5 min. cadascuna).
2. Exposició d'epítops. Les seccions provinents del ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata van ser incubades en tampó citrat pH 6, a 95° C durant 2 min. 30 seg. Mentre que les seccions del ratolí transgènic per la SHBG/ABP humana van ser incubades en tampó citrat pH 9.9, a 95° C durant 12 min. en el cas de les seccions de testicle i a temperatura ambient durant 1h per les seccions amb espermatozous. Totes les seccions van ser refredades a temperatura ambient durant 10 min.
3. Bloqueig de l'activitat peroxidasa del teixit. Les seccions van ser tractades amb peròxid d'hidrogen a temperatura ambient durant 7 min.
4. Incubació amb l'anticòs primari. Les seccions van ser incubades amb els anticossos policlonals de conill contra l'AR (2 µg/ml) i l'ER (3µg/ml) de ratolí (els dos de Santa Cruz Biotechnology), a temperatura ambient durant 30 min. Els anticossos policlonals de conill contra l'ER (3µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology) i l'ER (3 µg/ml) (PA1-311) de ratolí (Affinity Bioreagents Inc.) i la SHBG/ABP humana (1/50) van ser incubats a 4° C durant tota la nit.

5. Incubació amb l'anticòs secundari. Les seccions van ser incubades amb el *Rabbit EnVision-Plus Peroxidase reagent*, que conté immunoglobulines de cabra contra conill conjugades a peroxidasa, marcada amb un polímer de dextrà en un *Buffer* amb Tris-HCl, a temperatura ambient durant 30 min.
6. Rentats i revelat. Després dels rentats en PBS (3vegades, 5 min. cadascuna) les seccions van ser incubades en una solució que contenia el substrat cromogènic, peròxid d'hidrogen i DAB. Es va aturar la reacció de revelat i les seccions van ser contratenyides amb hematoxilina, i van ser deshidratades i montades amb DPX.

En la immunohistoquímica en la que es va utilitzar un anticòs primari de cabra, és a dir el policlonal de cabra contra el mER (sc-6821, Santa Cruz Biotechnology) es va realitzar seguint un altre protocol. Que va consistir en:

1. Desparafinització i rehidratació. Les seccions es van desparafinar amb xilens (3 vegades, 15 min. cadascuna) i es van rehidratar amb concentracions decreixents d'etanol (2 vegades, 5 min. cadascuna).
2. Exposició d'epítops. Les seccions van ser incubades en tampó citrat pH 6, a 95° C durant 2 min. 30 seg.
3. Bloqueig de l'activitat peroxidasa del teixit. Les seccions van ser tractades amb peròxid d'hidrogen, a temperatura ambient durant 7 min.
4. Bloqueig unions específiques. Es van incubar les seccions amb 3% de sèrum normal de conill durant 2 h a temperatura ambient.
5. Incubació amb l'anticòs primari. Tot seguit es van incubar amb l'anticòs policlonal de cabra contra ratolí ER (3 µg/ml), a 4° C durant tota la nit.

6. Incubació amb l'anticòs secundari. Després dels rentats amb PBS (2 vegades, 5 min. cadascuna), les seccions van ser incubades amb l'anticòs secundari que va consistir en IgG biotinilades de conill contra cabra (Vector Laboratories Inc.), a temperatura ambient durant 30 min.
7. Amplificació del senyal. A continuació les seccions es van tractar amb una solució que contenia complexos avidina-biotina (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories Inc.) a 37° C durant 45 min.
8. Revelat. Finalment les seccions es van revelar utilitzant 0.01% peròxid d'hidrogen i 0.05% DAB en PBS. Es va aturar la reacció de revelat, i les seccions es van contratenyir, deshidratar i montar.

II.3.3. Immunohistoquímica d' ER β i TUNEL amb 2 marcadors fluorescents

Aquestes dues tècniques es van realitzar una a continuació de l'altra en la mateixa secció de testicle. Es van fer servir seccions de ratolins transgènics per la SHBG/ABP de rata. El protocol va consistir en:

1. Desparafinització i rehidratació. Les seccions es van desparafinar amb xilens (3 vegades, 15 min. cadascuna) i es van rehidratar amb concentracions decreixents d'etanol (2 vegades, 5 min. cadascuna).
2. Permeabilització de les membranes. Les seccions es van tractar amb Proteïnasa K (20 μ g/ml) a temperatura ambient durant 15 min.
3. Exposició d'epítops. Les seccions van ser incubades en tampó citrat pH 6, a 95° C durant 2 min. 30 seg. i refredades a temperatura ambient durant 10 min.
4. Bloqueig unions específiques. Es van incubar les seccions amb 3% de sèrum normal de conill durant 2 h a temperatura ambient.

5. Incubació amb l'anticòs primari. Les seccions van ser incubades amb l'anticòs de cabra contra el mER (7.5 µg/ml) (sc-6821, Santa Cruz Biotechnology) a 4° C durant 16 h.
6. Incubació amb l'anticòs secundari. Després dels rentats amb PBS (2 vegades, 5 min. cadascuna), les seccions van ser incubades amb IgG de conill conjugades amb Rodamina contra cabra (Pierce Chemical Company, Rockford, IL), diluït 1/75 en PBS a temperatura ambient durant 1 h 30 min.
7. Preincubació dels *Buffer* de la TdT. A continuació es van rentar les seccions amb PBS (3 vegades, 5 min. cadascuna) i es van incubar amb el *Buffer* de la TdT a temperatura ambient durant 30 min.
8. Tot seguit es van incubar amb 0.05 U/µl de TdT (Roche Biochemicals) i 0.5 nM de Fluoresceïna 12 dUTP (Roche Biochemicals) en el TdT *Buffer* a 37° C durant 90 min.
9. La reacció es va aturar incubant les seccions en 300 mM NaCl i 300 mM de citrat sòdic a temperatura ambient durant 15 min.
10. Finalment, les seccions van ser rentades en PBS i muntades en *Immuno-Fluore Mounting Medium* (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA). El marcatge fluorescent va ser analitzat utilitzant un *Leica Laser Scanning Confocal Microscope* DMIRB/E. La Rodamina va ser excitada a 568 nm i la Fluoresceïna a 488 nm. Es van analitzar plans simples consecutius seguint l'eix Z del confocal.

III. ANEX

Gen Diana	Nº Accés del Gen Bank	Seqüència primers 5 min. →3'	Longitud del prod. ampl.	Tº aniling ° C	nº cicles
rABP	M38759	GAGAAGGGAGAGGTGGCCT GCTCAAGGCTACTTTGAATAC	954 pb	65	40
mABP	U85644	GGAGAAGAGAGACTCTGTGG GCTCAAGACCACTTTGACTC	953 pb	55.5	40
mAR	NM013476.1	GGAAGCCATTGAGCCAGGAGTG GGCAAATACGATCAGTCCCATCC	214 pb	54.5	40
mERα	M38651.1	CTGCGCAAGTGTTACGAAGTGGG CAGAACCTTTCGGGGAGCCTGGG	1.093 Kb	59.8	35
mERβ	U81451.1 NM010157.1	GAGGGGAAGTGCGTGGAAGG CCCGAGATTGAGGACTTGTACCC	399 pb	58.2	45
mFSHR	NM013523.1 AF095642.1	CGCTGGCTTTTTCACTGTC GGGATTCTTTCTGGAGTGG	682 pb	55.3	30
mP450 aromatasa	NM007810.1	TCAATACCAGGTCCTGGCTA GTATGCACTGATTCACGTTC	766 pb	53.7	35
mTf	J03299.1	ATCTGGGAGATTCTCAAAGT TCAATGCAGTCCTCAGTGGT	347 pb	54.5	30
mStar	L36062.1	GGAAGAAGGAAAGCCAGCAG GGAAGTCGGCACAATGATGG	1.064 Kb	57.4	35
mCypA	X52803	CAGATGGGGTAGGGACG ATGGTCAACCCACCACCGTG	569 pb	54 - 65	30
mVIM	NM011701	GTACGAGGAGGAGATGCGGG AGGGCAGCAGTGAGGTCAGG	379 pb	55	40
mTnPI	NM009407	CCAGCCGCAAGCTAAAGACTCATGC AGCTCATTGCCGCATACAAGTGGG	199 pb	55	40
SHBG/ABP humana 108Up 1148 Low	X05403	TGTCATGACCTTTGACCTCACC AGGGGGGTTCTTAGGTGGAGC	1061	59.3	40
SHBG/ABP humana Exo A1	X16351.1	TTCAAAGGCTCCCCCGCAGTGC	-	59	40
hERβ	AF051427	GGGAGCCACACTTCACCATTC ATCGCCAGTTATCACATCTGTAT	300	58	40
hERβex	AB006589	CTCAGCTGTTATCTCAAGACATGG GAGTTGATTAGAGGGTCACTGC	715	57.5	40
hP450 aromatasa	M28420	CAAGCTGTCACTCCCCATACCCC ACCAGTGCAGAATCCCACAGCTC	623	57	40

hAR	NM000044	CCGGATGTACAGCCAGTGTGTCC ATGGGAGGGTTAGATAGGGAGG	643	57	40
hERα	XM045966	CGGCCATGAGTTCCAGATTAGGG TCCAGCAGCAGGTCATAGAGGGG	271	58	40
hCypA	XM004890	ATGGTCAACCCACCGTG TGCAATCCAGCTAGGCATG	663	55-60	30
hS14	XM042550.1	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA CAGGTCCAGGGGTCTTGGTC	242	55-60	30

RESULTATS

RATOLI TRANSGÈNIC PER L'ABP DE RATA

Estudis de fertilitat

Per tal de realitzar aquest estudi es van creuar els ratolins transgènics per l'ABP de rata amb ratolins C57BL/6 normals. Durant el primer any de vida per tal de servir de controls, també es van tenir diferents parelles de ratolins CD1 i C57BL/6 creuant-se. Els ratolins CD1 va tenir un número de cries per ventrada de 14.7 ± 2.5 , mentres que les parelles de C57BL/6 van ser de 7.1 ± 1.6 . Es van creuar diferents ratolins transgènics heterocigots per l'ABP de rata amb famelles C57BL/6 normals i aparentment tenien una fertilitat normal, les cries per ventrada eren de 7.64 ± 1.86 , aquests ratolins es mantenien fèrtils fins als nou mesos de vida (9.42 ± 1.37 cries per ventrada). A partir d'aquesta edat van esdevindre infèrtils, mentres els ratolins controls eren fèrtils encara a l'any de vida.

Anàlisi Morfològic

En les seccions tenyides amb hematoxilina-eosina de ratolins transgènics homocigots de 3, 6 i 12 mesos d'edat, es van poder observar tots els estadiatges de l'espermatogènesi (Fig.1 a). Tot i així es van poder observar alguns túbuls on no existien tots els estadiatges posteriors a la primera divisió meiótica (Fig.1 b). A més a més, en d'altres túbuls es va poder observar un acúmulo de paquitens i espermatocits en metafase (Fig. 1 d), algun dels quals semblava tenir una morfologia i localització anormal. De manera freqüent també es van trobar túbuls amb presència de cèl.lules picnòtiques tant a la llum del túbul com dins de l'epiteli seminífer (Fig.1 c). En alguns túbuls en estadiatge concret es va poder observar la manca d'un tipus cel.lular específic de l'estadiatge, així, per exemple, en els túbuls amb acumulació d'espermatocits en paquitè no s'observen espermatides ellongades (Fig. 1 c).

Es van analitzar també ratolins transgènics heterocigots de 3 i 6 mesos d'edat. Aquests presentaven una gran variabilitat pel que fa a les alteracions morfològiques, que anaven des d'una certa normalitat fins a presentar les mateixes alteracions que els ratolins transgènics homocigots.

Pel que fa als controls, van ser analitzats ratolins no transgènics, ratolins CD1 i ratolins C57BL/6 de 3 i 6 mesos d'edat. Les seccions presentaven una espermatogènesi normal, tot i que en algun túbul de manera molt aïllada es va poder detectar la presència d'alguna cèl.lula picnòtica en el lumen de l'epiteli seminífer. La presència d'aquestes cèl.lules picnòtiques era més freqüent en les seccions dels ratolins no transgènics i

C57BL/6 que no pas en les dels CD1, això pot ser degut a que la soca de CD1 no són ratolins *inbred*.

IMATGE

Anàlisi de la fragmentació del DNA

Per tal d'esbrinar si la pèrdua de cèl·lules germinals era degut a l'apoptosi i per tal d'identificar el tipus cel·lular que es perdia, es van realitzar les tècniques de Tunel i extracció de DNA i electroforesi en gel d'agarosa.

- _ L'electroforesi en gel d'agarosa del DNA de baix pes molecular extret del testicle de dos ratolins transgènics per l'ABP de rata, va revelar la presència

d'uns fragments de DNA de 180 pb i múltiples d'ell, que corresponen a fragments internucleosomals que es generen durant el procés d'apoptosi, anomenat *ladder* (Fig. 2). Els ratolins no transgènics de la mateixa ventrada que els transgènics no presentaven els fragments aquests de *ladder*, presentant una banda més intensa de 90 pb.

IMATGE

- L'anàlisi de Tunel es va realitzar en seccions de testicle de ratlins transgenics homocigots i heterocigots de 3 i 6 mesos d'edat. Aquestes seccions van presentar un increment del número de cèl.lules marcades per túbul marcat i el número de túbuls marcats per total de túbuls comparan-les amb les seccions del ratolins controls (Taula 1). Aquest increment va ser més evident en els ratolins transgènics homocigots, mentres que els ratolins transgènics heterocigots van presentar uns valors més variables (Taula 1). Les cèl.lules marcades es van trobar localitzades en alguns túbuls, així que es van trobar túbuls sense cap

mena de marcatge (Fig.3 b). Es van observar aquests túbuls amb cèl.lules marcades a més augment, i es va poder observar que les cèl.lules que s'estaven morien eren espermatocits en paquitè i en metafase (Fig.4), a més a més algunes espermatides rodones i espermatogonies també presentaven marcatge. No es va observar cap mena de marcatge en espermatides ellonagades.

Pel que als controls, es van utilitzar ratolins no transgènics, CD1 i C57BL/6 de 3 i 6 mesos d'edat. En l'anàlisi de les seccions es va poder observar que existien cèl.lules marcades en l'epiteli seminífer de manera aïllada en alguns túbuls (Fig. 3 a). En les seccions del ratolins C57BL/6 de 6 mesos d'edat es va poder detectar un increment del número de cèl.lules marcades per túbul comparant amb els CD1 (Taula 1). A l'anàlitzar les seccions del ratolins controls a més augment es va poder observar que la majoria de cèl.lules que es morien eren espermatocits primaris, es va observar també marcatge en alguna espermatida rodona, espermatogonia i espermatida ellongada.

IMATGES

IMATGES

Animals	n	Edat (mesos)	CM / TM	TM / TT
CD1	3	3	1.46 ± 0.07	0.030 ± 0.005
CD1	3	6	1.95 ± 0.05	0.050 ± 0.007
C57BL/6	3	3	1.42 ± 0.24	0.026 ± 0.009
C57BL/6	3	6	2.01 ± 0.09	0.135 ± 0.020
- / -	3	3	2.54 ± 0.29	0.036 ± 0.010
+ / -	3	3	4.05 ± 0.55	0.097 ± 0.030
+ / -	3	6	4.62 ± 1.23	0.220 ± 0.025
+ / +	3	3	7.26 ± 0.28	0.146 ± 0.020
+ / +	3	6	7.01 ± 0.63	0.350 ± 0.020
+ / +	1	12	7.41	0.300

Taula 1. Contatges de les seccions testiculars analitzades per Tunel de ratolins CD1, ratolins C57BL/6, ratolins no transgènics (- / -), ratolins transgènics per l'ABP de rata heterocigots (+ / -) i ratolins transgènics per l'ABP de rata homocigots (+ / +). CM / TM correspon al número de cèl.lules marcades per túbul marcat, i TM / TT correspon al número de túbuls marcats per total de túbuls.

Expressió d'ABP

Per tal de veure si la quantitat d'apoptosi que presentava cada ratolí transgènic era deguda a la sobreexpressió de l'ABP de rata, es van analitzar els nivells d'expressió a testicle de mRNA d'ABP de rata comparant-los amb els nivells d'expressió de la Ciclofilina A per RT-PCR. Per realitzar això es va extreure mRNA de testicle dels

mateixos animals que es van analitzar er Tunel. Els ratolins transgènics homocigots van presentar uns nivells alts i constants d'expressió de mRNA d'ABP de rata (*ratio* rABP/CypA 1.16 ± 0.019), els ratolins heterocigots van presentar uns nivells més baixos però amb una variabilitat més gran (*ratio* rABP/CypA 0.77 ± 0.16), mentres que els ratolins controls no transgènics no van presentar expressió de mRNA per l'ABP de rata com era d'esperar (Fig.5).

Es va poder trobar una correlació positiva en els ratolins transgènics heterocigots entre els nivells d'expressió de mRNA d'ABP de rata i el número de cèl.lules apoptòtiques per túbul marcat (Fig.5).

IMATGES

Per tal d'esbrinar els nivells d'Abp endògena dels ratolins, es va analitzar també els nivells d'expressió d'ABP de ratolí. Es va poder observar que els nivells d'expressió d'ABP de ratolí seguien un patró molt similar al de l'ABP de rata. així, els ratolins transgènics homocigots presentaven nivells alts d'expressió ($ratio\ mABP/CypA\ 1.76 \pm 0.064$), els ratolins heterocigots uns nivells més baixos i variables ($ratio\ mABP/CypA\ 1.35 \pm 0.127$) i els ratolins no transgènics uns nivells més baixos encara però detectables ($ratio\ mABP/CypA\ 1.18 \pm 0.047$) (Fig.5).

Degut a que tenien un patró molt semblant i que els gens de ratolí i rata són molt semblants, va caldre comprovar l'especificitat dels *primers* utilitzats per amplificar el mRNA d'ABP de rata i ratolí. De manera que, productes de PCR d'ABP de rata i ratolí van ser purificats i digerits amb enzims de restricció específics de cada cDNA. Així, el cDNA d'ABP de rata va ser digerit per l'enzim Acc I i no digerit amb l'enzim Hha I, mentre que el cDNA d'ABP de ratolí va ser digerit per l'enzim Hha I i no digerit per l'enzim Acc I (Fig.6). D'altra banda, aquests cDNA's van ser seqüenciats, demostrant-se que només hi havia un producte amplificat en cada cas. El cDNA amplificat de rata va resultar idèntic al transcript d'ABP de rata introduït al GenBank (nucleòtids 36-990 seqüència M31179) i el mateix va passar amb el cDNA amplificat de ratolí (nucleòtids 9-964 seqüència U85644).

IMATGES

Anàlisi del contingut de DNA per citometria de fluxe

Per determinar si la distribució de les diferents poblacions de cèl.lules germinals dels ratolins transgènics per l'ABP de rata era diferent a la dels ratolins controls, es va mesurar el contingut de DNA per citometria de fluxe de cel.lules germinals marcades amb Iodur de Propidi (PI). En els ratolins no transgènics es va detectar tres pics en l'histograma (Fig.7 A i B) i tres àrees de cèl.lules diferents en el *dot blot* (contingut de DNA respecte el *light-scatter*) (Fig.7 C). Tant els pics com les àrees van correspondre a les cèl.lules haploids c (espermatides rodones i ellongades), cèl.lules diploids 2c (espermatogonies, espermatocits primaris en preleptotens i espermatocits secundaris) i cèl.lules tetraploids 4c (espermatogonies, leptotens, zigotens i espermatocits primaris en paquitè). Una replicada de les mostres va ser tractada amb RNasa A, tant els pics com les àrees es van desplaçar cap a la dreta, fenomen que ja havia estat descrit per altres (26) i que es degut a que les mostres tenen menys contingut de DNA (de fet es va eliminar el RNA).

IMATGES

L'anàlisi del ratolins transgènics va revelar l'alteració dels percentatges de les poblacions de cèl.lules germinals, amb una reducció del pic de cèl.lules haploids i un increment del pic de cèl.lules tetraploids (Fig. 7 D i G, Taula 2). Els ratolins transgènics homocigots, així com algun ratolí transgènic heterocigot presentaven una disminució del número de cèl.lules haploids c més gran, i un increment major de cèl.lules tetraploids 4c. A més a més, apareixia un nou pic de cèl.lules aneuploids, que tenien un contingut de DNA lleugerament inferior al de les cèl.lules tetraploids 4c quan no es va fer servir RNasa (Fig.7 D i G, asteriscs), però que era proper a 3c quan les mostres van ser tractades amb RNasa (Fig.7 E i H, asteriscs). Pel que fa al *dot blot* dels ratolins transgènics, l'àrea que correspon al pic aneuploid va apèixer respecte a l'àrea de cèl.lules 4c més baixa i desplaçada cap a l'esquerra (Fig.7 F i I, asteriscs), que es l'ubicació clàssica de cèl.lules apoptòtiques d'una població.

Genotip	n	c	2c	Aneuploid	4c
- / -	3	64.80 ± 3.5	15.50 ± 2.9	1.79 ± 1.6	12.26 ± 0.7
+ / -	4	55.35 ± 3.9	12.20 ± 1.8	9.80 ± 2.1	11.80 ± 1.7
+ / +	3	53.10 ± 1.0	10.23 ± 2.5	15.08 ± 2.1	16.96 ± 1.2

Taula 2. Les dades estan presentades en % de cèl.lules haploids (c), diploids (2c), aneuploids i tetraploids (4c) corresponents a ratolins no transgènics (- / -), ratolins transgènics per l'ABP de rata heterocigots (+ / -) i ratolins transgènics per l'ABP de rata homocigots (+ / +).

IMATGES

Expressió gènica en el ratolí transgènic per l'ABP de rata

La proteïna transportadors d'andrògens o ABP té una gran afinitat per les hormones esteroidees sexuals. Es va estudiar bàsicament l'expressió de gens directa o indirectament relacionats amb els esteroids, tot i que s'en van mirar d'altres. L'anàlisi es va fer per RT-PCR d'mRNA extret de testicle total, de cèl.lules de Sertoli + cèl.lules germinals o de cèl.lules germinals aïllades. Es va voler veure si els canvis en l'expressió d'aquests gens podien estar implicats en l'aturada meiótica i la mort per apoptosi de cèl.lules.

En el testicle total no es va poder detectar cap canvi en l'expressió del receptor d'andrògens (AR) o de *Steroidogenic Acute Regulatori protein* (Star) comparant

l'expressió en ratolins no transgènics, i ratolins transgènics per l'ABP de rata heterocigots i homocigots. En els ratolins transgènics heterocigots i homocigots es van detectar uns nivells elevats d'expressió del receptor d'FSH (FSHR), d'aromatasa P450 scc i de receptor d'estrògens beta (ER β), així com una disminució dels nivells de receptor d'estrògens alfa (ER α).

Al conjunt de cèl.lules aïllades de Sertoli i germinals es va poder observar que als ratolins transgènics heterocigots i homocigots hi havia un augment de l'expressió de l'aromatasa P450 scc i del receptor de FSH (FSHR). I una disminució en els nivells d'expressió de Star i transferrina (Tf), quant se'ls va comparar amb els ratolins no transgènics.

A les cèl.lules germinals aïllades dels ratolins transgènics heterocigots i homocigots es va poder detectar un augment d'expressió del ER α .

Es pot resumir que els ratolins transgènics per l'ABP de rata no presenten canvis d'expressió en el AR, tenen uns nivells elevats d'expressió de l'aromatasa P450 scc, ER α i FSHR, i una disminució de l'expressió del ER β i Tf. Pel que fa a l'expressió de l'Star, en principi estava descrit que s'expressava a les cèl.lules de Leydig i de Sertoli, si tenim en compte que a nivell de testicle total no hi ha canvis en l'expressió, i que a les cèl.lules de Sertoli transgèniques hi ha uns nivells més baixos, podem deduir que les cèl.lules de Leydig dels ratolins transgènics tenen uns nivells més elevats d'expressió d'Star respecte de les cèl.lules de Leydig dels ratolins no transgènics.

GRAFIQUES

Immunohistoquímiques

Per tal de confirmar els resultats de les RT-PCR pel que fa als AR, ER i ER , es van realitzar les immunohistoquímiques en 4 ratolins no transgènics, 6 ratolins transgènics heterocigots i 6 ratolins transgènics homocigots.

- _ En l'immunohistoquímica del AR no es van veure diferències entre els ratolins no transgènics i els transgènics. Es va observar el marcatge típic a l'interstici corresponent a les cèl.lules de Leydig, i el marcatge a la base de l'epiteli seminífer corresponent a les cèl.lules de Leydig.

IMATGE

- _ En l'immunohistoquímica del ER , tampoc es van trobar diferències en el marcatge entre els ratolins no transgènics i els transgènics. El marcatge es va localitzar a les cèl.lules de Leydig i a les cèl.lules germinals de l'epiteli seminífer.
- _ En l' immunohistoquímica del ER es van fer servir dos anticòsos diferents. Amb l'anticòs de Santa Cruz als no transgènics no va apareixer marcatge, mentres que als ratolins transgènics va apareixer marcatge a les espermatides ellongades i als espermatocits en paquitè. Pel que fa a l'anticòs de PA es va poder observar marcatge en els ratolins no transgènics, concretament a les cèl.lules de Sertoli i espermatides ellongades. En els ratolins transgènics a part del mateix marcatge que el no transgènics es va obtenir marcatge als espermatocits en paquitè a l'igual que l'altre anticòs.

Els espermatocits en paquitè que es marquen en els ratolins transgènics semblen morfològicament el mateix tipus cel·lular que es mor per apoptosi. A l'igual que en el Tunel les cèl·lules que es marquen per ER es troben agrupades en determinats túbuls.

IMATGE

Immunohistoquímica d'ER β i Tunel en seccions consecutives

Aquestes dues tècniques es van realitzar en seccions consecutives per tal d'esbrinar si les cèl·lules que es marcaven per immunohistoquímica d'ER i per Tunel eren les mateixes. No es van poder identificar cèl·lules que estiguessin marcades en les dues seccions, tot i així es va aprofitar l'experiment per tal de determinar l'estadiatge de les cèl·lules que es marcaven a l'immunohistoquímica d'ER i les cèl·lules que es marcaven en el Tunel.

Així, en els ratolins transgènics homocigots es va poder observar que les cèl·lules apoptòtiques es localitzaven en els estadiatges I-III i XII-XIV. De la mateixa manera les cèl·lules germinals marcades en immunohistoquímica per ER es van localitzar en els mateixos estadiatges I-III i XII-XIV, veient-se un marcatge lleu en l'estadiatge VII.

IMATGE

Expressió d' ER β en les cèl.lules germinals apoptòtiques

Aquestes dues tècniques es van tornar a fer, però aquest cop per tal d'assegurar si es tractaven de les mateixes cèl.lules es van fer sobre la mateixa secció i amb anticossos fluorescents.

En els ratolins no transgènics es va poder veure alguna cèl.lula apoptòtica aïllada (A), que a la vegada es marcava per ER a l'immunohistoquímica (B), i es va poder observar la colocalització de les dues senyals (C). Pel que fa als ratolins transgènics homocigots en els Tunel es va poder observar l'increment de cèl.lules marcades que es trobaven agrupades en determinats túbuls (D). Aquestes mateixes cèl.lules presentaven un fort marcatge per ER a l'immunohistoquímica (E), i clarament es van colocalitzar les dues senyals (F).

IMATGE

Northern Blot

Per tal de confirmar aquest augment de l'expressió d' ER observat en les RT-PCR es va realitzar el Northern. Amb una sonda específica de 300 pb per ER es van detectar dos transcrits diferents. Un transcrypt petit, d'aproximadament 1.4 Kb, i que coresponia al tamany esparat, *i transcrypt gran d'aproximadament 2.6 Kb*. Els dos transcrits estaven sobreexpressats en el ratolins transgènics homocigots i heterocigots quan els comparem amb els normals, tot i que el transcrypt petit tenia una diferència més gran d'expressió comparant amb el gran.

IMATGE

Western blot

Els resultats obtinguts a l'immunohistoquímica suggerien un augment a nivell de proteïna del receptor d'ER , per confirmar-ho es va fer el western blot. L'anticòs va detectar dues proteïnes de diferent tamany, una de 80 KDa i una de 55 KDa. La proteïna de tamany esperat va ser de 55 KDa, i a l'igual que passava amb el northern blot, la banda de 55 KDa era sobreexpressada als ratolins transgènics homocigots i heterozigots, corroborant perfectament els resultats per immunohistoquímica. Pel que fa a la banda superior de 80 KDa no existien diferències significatives entre els ratolins transgènics i els ratolins normals.

Per tal de comprovar l'especificitat de l'anticòs es va realitzar estudis de preabsorció de l'anticòs amb el pèptid contra el que havia fet. Es va poder observar com les dues bandes que es detectaven en el western desapareixien.

IMATGE

Cocultius de cèl.lules de Sertoli i Paquitens o Espermatides rodones

Primer de tot es va comprovar per RT-PCR l'expressió d'ABP de rata en totes les mostres i condicions dels dies 1 i 5. Es va poder observar que l'ABP de rata es sobreexpressava en totes les condicions de cocultius que tenien cèl.lules de Sertoli transgèniques quan les comparaves amb les que tenien cèl.lules de Sertoli no transgèniques, tant el dia 1 de cocultiu com el dia 5. També es va poder observar que l'expressió d'ABP de rata disminuïa amb el pas del dies, així, els nivells d'expressió eren més alts el dia 1 de cocultiu que el dia 5.

Es va realitzar el *differential display* comparant les cèl.lules de Sertoli transgèniques amb les no transgèniques, i el cocultiu de cèl.lules de Sertoli amb paquitens transgèniques i no transgèniques. Es van obtenir uns patrons d'expressió molt diferents.

IMATGE

Es va començar pels patrons de cèl.lules de Sertoli, i es van retallar un total de 12 bandes diferencials, tant disminuïdes com augmentades a les cèl.lules de Sertoli. Van rebre els noms de G4B1, 2, 3, , G4B12. Es van començar a analitzar les 4 bandes diferencials, que van ser G4B1, 2, 3 i 12. Es van retallar del gel, reamplificar, clonar i seqüenciar. De la banda G4B1 es van obtenir 3 seqüències diferents, G4B1.1, 1.2 i 1.3. Mentres que de les altres 3 bandes es van obtenir dues, G4B2.1, G4B2.2, G4B3.1, G4B3.2, G4B12.1 i G4B12.2 (anex II).

Aquestes bandes es van introduir a les bases de dades i van ser analitzades, però no es va trobar cap similitut. El problema va ser que aquestes bandes corresponien a regions 3' UTR dels mRNA, i en molts casos aquestes seqüències no estan introduïdes a les bases de dades. D'altra banda, es va intentar fer RACE 5' per tal d'allargar la seqüència, però degut a que eren seqüències riques en A i T tots els *primers* utilitzats van allargar altres mRNA de la llibreria de testicle que es va utilitzar.

Aquest experiment es va tornar a repetir però aquest cop es fer amb RNA's de testicle total de ratolins transgènics i no transgènics, aquets cop es van obtenir cDNA's més llargs per que fos més fàcil l'identificació. Es van obtenir XXXX bandes i tal i tal. SEQÜENCIES.

Així, cada 2-3 mesos es van consultant les bases de dades i tornant a anilitzar les seqüències. Fins ara s'ha obtingut:

SEQÜENCIES.

RATOLI TRANSGENIC PER L'SHBG HUMANA

Northern

Es fer una membrana amb RNA's de cervell, ronyó, fetge, teixt adipós i epidídim de ratolins transgènics shbg11 i ratolins no transgènics, per tal de veure on s'expressava l'SHBG humana.. Es va hibridar aquesta membrana amb una sonda específica de 556 pb de la regió 3' del cDNA de l'SHBG humana. Com a resultat es va obtenir que l'SHBG humana s'expressava al fetge i ronyó dels ratolins transgènics shbg11.

IMATGE

D'altre banda es van fer membranes amb RNA's extrets de cèl.lules de Sertoli aïllades i cèl.lules gerimnals aïllades provinents de ratolins no transgènics, ratolins transgènics shbg11 i shbg4. Es van hibridar les membranes amb tres sondes diferents, una sonda específica de 556 pb de la regió 3' del cDNA de l'SHBG humana, una sonda específica de l'ABP de ratolí de la regió 3' del cDNA i una sonda específica de l'exó 1 alternatiu de l'SHBG humana (exó 1 Alternatiu o exó A).

Pel que a l'SHBG humana amb la sonda de la regió 3' es va veure que s'expressava tant a les cèl.lules de Sertoli com a les cèl.lules germinals dels ratolins transgènics shbg11, i no s'expressava ni a les cèl.lules de Sertoli ni a les cèl.lules germinals de ratolins controls i ratolins transgènics shbg4.

IMATGE

El patró d'expressió que es va poder veure amb la sonda específica corresponent a l'exó A del transcript alternatiu de l'SHBG va ser el mateix.

IMATGE

Respecte a sonda específica per l'ABP de ratolí es va veure marcatge a les cèl.lules de Sertoli tant de ratolins controls, com transgènics shbg11 i shbg4. No es va veure marcatge a les cèl.lules germinals dels ratolins shbg4, i si a les cèl.lules germinals dels ratolins transgènics shbg11.

IMATGE

Per tal de comprovar el grau de contaminació de cada una de les extraccions de cèl.lules, aquestes membranes es van hibridar amb sondes específiques per cadascun dels tipus cel.lulars. Així, es van fer servir sondes per la Vimentina, que s'expressa únicament a cèl.lules somàtiques, i que per tant la trobarem només expressada a cèl.lules de Sertoli. I d'altra banda, una sonda per TP1, que és una proteïna de transició i que s'expressa únicament a les cèl.lules germinals. Es va poder observar que l'extracció de cèl.lules de sertoli no era molt pura, i que existia una contaminació important de cèl.lules germinals. Mentres que l'extracció de cèl.lules germinals era molt pura i no tenia cap contaminació de cèl.lules de Sertoli.

IMATGE

Immunohistoquímica

Es va realitzar en seccions de testicle de ratolins no transgènics, ratolins transgènics shbg4 i ratolins transgènics shbg11. Les seccions testiculars dels ratolins controls no presentaven cap tipus de marcatge. Els ratolins transgènics shbg4 presentaven un marcatge intens a tots els intersticis, marcatge que corresponia a l'SHBG plasmàtica, però a dins de l'epiteli seminífer no hi havia cap tipus de marcatge. Les seccions del ratolins transgènics shbg11 presentaven el mateix marcatge a nivell intersticial que les seccions dels ratolins shbg4, però a diferència d'aquests presentaven marcatge a l'interior dels túbuls seminífers. El marcatge estava localitzat a les cèl.lules germinals, més concretament, a les cèl.lules germinals durant tots els estadiatges de l'elongació, de l'estadiatge IX fins al XII. El marcatge estava a l'acrosoma, per tant es va poder localitzar a les espermatides rodones on es comença a formar l'acrosoma (estadiatge IX) fins que s'acaba de formar l'espermatozou (estadiatge XII). El marcatge es va poder veure fins que s'alliberen els espermatozous (estadiatge VII).

IMATGE

Es van realitzar també immunohistoquíques de seccions d'epidídim i extensions d'esperma provinents de ratolins transgènics shbg4 i shbg11. I com era d'esperar es va poder veure únicament marcatge als espermatozous dels ratolins transgènics shbg11.

IMATGES

Delfia

Es van utilitzar els extractes proteïcs de cèl.lules de Sertoli (2 extractes de dos animals diferents) i cèl.lules germinals de ratolins no transgènics i ratolins transgènics shbg4 i shbg11, i d'epidídim de ratolins controls i transgènics shbg11. Totes les mostres tenien una concentració de 7 µg/µl, i van ser utilitzades per l'assaig a una dilució 1/50. Els valors obtinguts van ser els següents:

	WT SC:	WT GC: 2775	WT EP: 753
	2905 ± 89		
	shbg4 SC:	shbg4 GC:	
C - :	3521 ± 1474	2876	
2766 ± 314	shbg11 SC:	shbg11GC:	shbg11 EP :
	13120 ± 5564	6567	14630
		shbg11 GC+S:	
		10005	

Es va detectar la presència de proteïna als extractes del ratolí transgènic shbg11, tant de cèl.lules germinals, com de Sertoli i epidídim. Els extractes de ratolins no transgènics i transgènics shbg4 tenien nivells de detecció semblants als del control negatiu de la tècnica.

Especificitat de l'anticòs anti-SHBG humana

Per tal de coprovar que l'anticòs no tenia cap tipus de crosreacció amb la proteïna de ratolí o de rata, es van transfectar de manera estable cèl.lules CHO amb constructes que expressaven la SHBG/ABP de rata, i la SHBG/ABP de ratolí. Es van fer extractes proteïcs d'aquestes cèl.lules i posteriorment es van fer dos *Westerns* corrent un extracte proteïc d'epidídim de ratolí transgènic shbg11 com a control. En un *Western* es va utilitzar un anticòs anti-ABP de ratolí que només va detectar la proteïna a l'extracte de cèl.lules CHO que expressaven la proteïna de ratolí. I l'altre *Western* es va hibridar amb l'anticòs anti-SHBG humana, que només va detectar la proteïna a l'extracte d'epidídim de ratolí transgènic shbg11.

IMATGES

III. TESTICLE I ESPERMA HUMÀ

III.1. RT-PCR

Es va utilitzar per aquesta tècnica una mostra de testicle normal i dues mostres de testicle de pacients amb problemes de fertilitat. La biòpsia testicular va demostrar que no tenien cèl.lules germinals al testicle i només hi havia cèl.lules de Sertoli. Els cDNAs d'aquestes mostres van ser amplificats amb *primers* específics per a la SHBG/ABP humana (exó 2-8) i com a gen control es va amplificar la CypA humana (Figura 26).

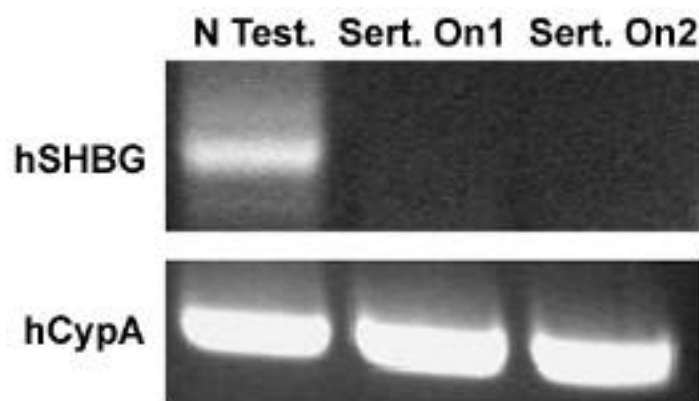


Figura 26. Expressió del mRNA de la SHBG/ABP humana (hSHBG) i la Ciclofilina A (CypA) analitzats per RT-PCR, en mostres de testicle humà normal (N Test.) i de testicles de pacients que només contenen cèl.lules de Sertoli (Sert. On1 i Sert. On2).

Es va detectar la presència d'un *transcript* al testicle corresponent a la SHBG/ABP humana, mentre que en les mostres dels dos pacients no es va amplificar res.

III.2. Immunohistoquímica

Es va realitzar en seccions de testicle humà normal utilitzant l'anticòs anti-SHBG/ABP humana i un anticòs secundari fluorescent. Es va poder detectar marcatge a l'interior dels túbuls seminífers a nivell dels espermatozous (Figura 27B). També hi havia marcatge a nivell dels intersticis, però aquest marcatge també va ser vist en el control negatiu de la tècnica, això pot ser degut a que les cèl.lules de Leydig són autofluorescents (Figura 27A i B).

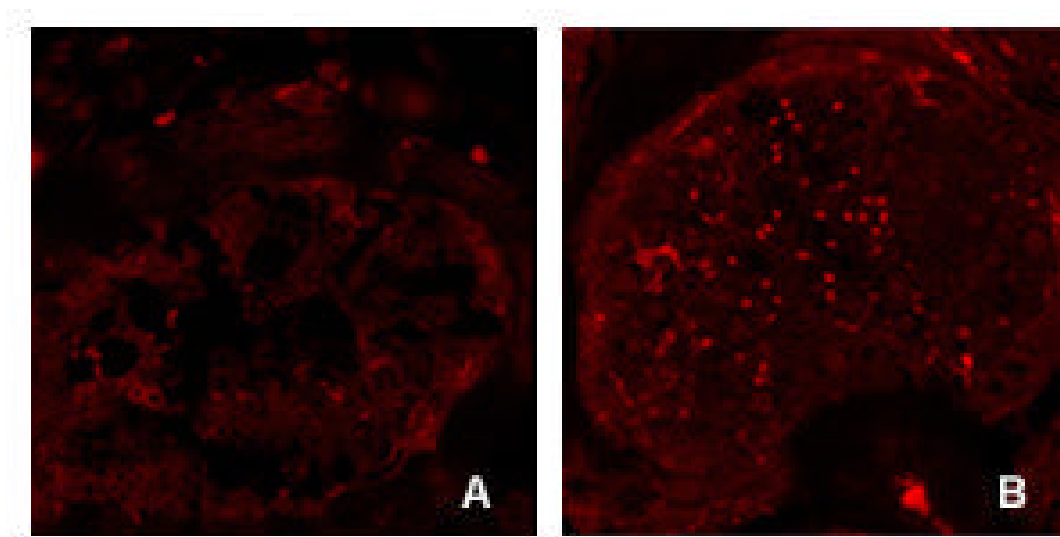


Figura 27. Immunolocalització de la SHBG/ABP humana en seccions testiculars normals (B). La secció testicular de control negatiu no es va incubar amb l'anticòs primari (A).

III.3. Western Blot

Es va realitzar aquesta tècnica amb extractes proteïcs de testicle, d'epidídim i de vesícula seminal. En totes les mostres es van poder detectar dues bandes que corresponien a la SHBG/ABP humana, els tamanys eren aproximadament de 52 i 48 KDa, que correspondrien a la proteïna SHBG/ABP plasmàtica i possiblement una forma desglicosilada de la mateixa proteïna. Per tal de comprovar l'especificitat de la banda, es van realitzar assajos de bloqueig amb proteïna recombinant humana purificada. Aquestes bandes van resultar ser específiques (Figura 28).

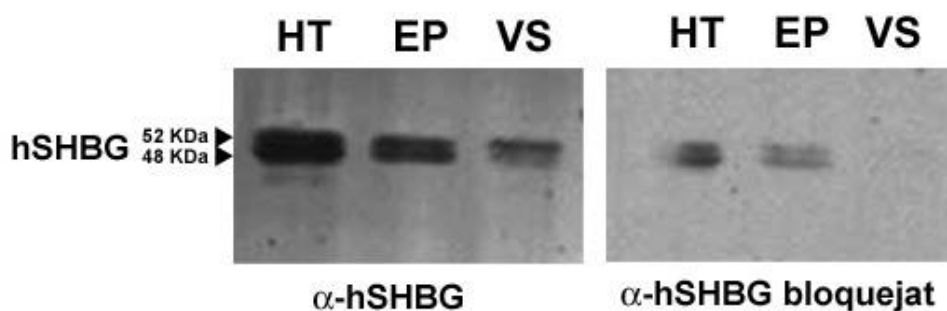


Figura 28. Expressió de la proteïna SHBG/ABP humana (hSHBG) (panel esquerra) i assaig de bloqueig amb proteïna recombinant (panel dreta) en mostres de testicle humà (HT), epidídim (EP) i vesícula seminal (VS), mitjançant *Western Blot*.

Es va realitzar un *Western Blot* amb un extracte proteïc de testicle total i un extracte proteïc d'espermatozous, es van detectar les dues bandes corresponents a la SHBG/ABP al testicle, i es va detectar una banda als espermatozous que era lleugerament més petita a la banda de 48 KDa del testicle (Figura 29).

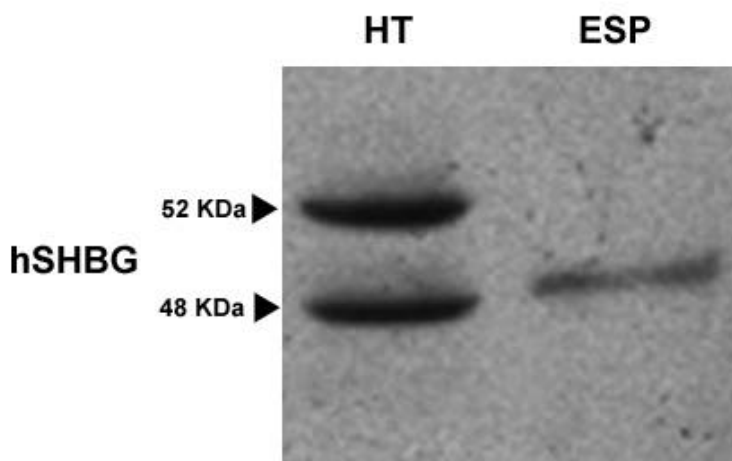


Figura 29. Expressió de la proteïna SHBG/ABP humana (hSHBG) en mostres de testicle humà (HT) i espermatozous (ESP), mitjançant *Western Blot*.

També es van realitzar *Western Blot* amb extractes proteïcs d'espermatozous humans, líquid seminal sense cèl.lules i semen total de diferents donants. Com a control es va córrer un extracte de testicle total. Pel que fa a les mostres d'espermatozous, en els dos pacients fèrtils es va poder detectar la banda propera als 48 KDa. A la mostra d'espermatozous del pacient infèrtil no es va detectar la proteïna. Pel que fa als extractes de proteïna obtinguts de líquid seminal sense cèl.lules dels pacients fèrtils es van detectar la banda corresponent a la SHBG/ABP plasmàtica, igual a la de testicle, però no es va poder detectar al líquid seminal del pacient infèrtil ni al líquid seminal del pacient vasectomitzat. Pel que fa a la mostra de semen total també va aparèixer la banda de la SHBG/ABP plasmàtica. Es van fer també els assajos de bloqueig amb la proteïna recombinant per tal de veure si eren específiques o no les bandes detectades. Es va poder observar com es bloquejaven tant les bandes de SHBG/ABP del testicle, d'espermatozous, de líquid seminal i de semen total. Les bandes inespecífiques del líquid seminal i semen

total no es van bloquejar. Pel contrari les bandes de tamanyos diferents de líquid seminal i semen no es van bloquejar (Figura 30).

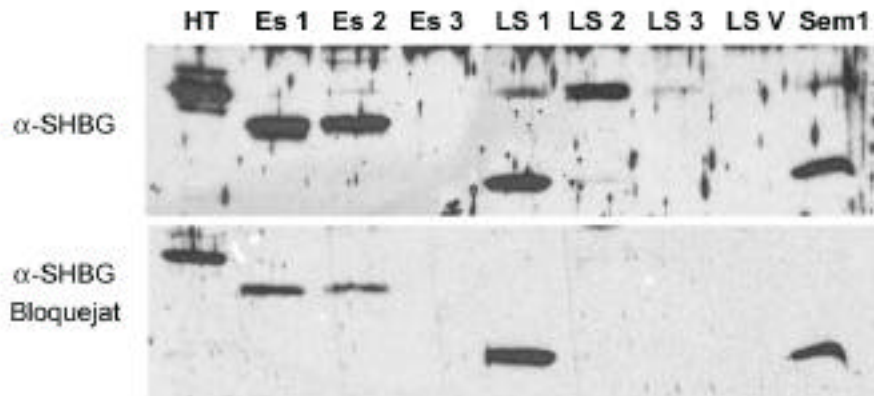


Figura 30. Expressió de la proteïna SHBG/ABP humana (hSHBG) (panel superior) i assaig de bloqueig (panel inferior) en mostres de testicle humà (HT), espermatozous (Es) i líquid seminal depacients fèrtils (1 i 2) i infèrtils (3), líquid seminal d'un pacient vasectomitzat (LS V) i semen total (Sem).

III.4. DELFIA

Es va realitzar aquesta tècnica amb extractes protèics de testicle (HT), epidídim (EP), vesícula seminal (VS) i espermatozous (ESP). Les mostres estaven a una concentració de proteïna de 3 µg/µl i es van diluir 1/10. Els resultats van ser:

C - : 1652 HT : 6142 EP : 8976 VS : 4632 ESP : 4208

Es va detectar proteïna de SHBG/ABP a totes les mostres, els nivells més alts es van detectar a l'epidídim, després testicle total, vesícula seminal i espermatozous.

IV. PRÒSTATA

IV.1. Línies Cel.lulars

IV.1.1. RT-PCR

Es van amplificar cDNAs provinents de cèl.lules PC3, LNCaP, CAHPV10 i PZHPV7, amb *primers* específics per la SHBG/ABP (exó 2-exó 8), per la SHBG/ABP alternativa (exó A-exó 8), l'AR, l'ER α , l'ER β , l'ER γ , el P450 aromatasas i la CypA. Com a resultat es va obtenir:

- Les cèl.lules PC3 expressaven 3 formes de SHBG/ABP que s'amplificaven amb els *primers* de l'exó A i l'exó 8, van ser clonats i seqüenciats. D'altra banda, expressaven l'AR i nivells molt baixos d'ER α , mentre que expressaven uns nivells alts d'ER β , d'ER γ i de P450 aromatasas (Figura 31).
- Les cèl.lules LNCaP expressaven les mateixes formes de SHBG/ABP alternatives que les PC3. Es va detectar una expressió d'AR, més baixa de P450 aromatasas, molt baixa d'ER α i d'ER β , i no es va detectar expressió d'ER γ (Figura 31).
- Les cèl.lules CAHPV10 no expressaven les formes de SHBG/ABP alternatives, ni d'AR i d'ER γ . Mentre que expressaven nivells baixos d'ER α , d'ER β i de P450 aromatasas (Figura 31).
- Les cèl.lules PZHPV7 no expressaven cap forma de SHBG/ABP alternativa. Expressava nivells baixos d'ER α i no es va detectar expressió d'AR, d'ER β , d'ER γ ni de P450 aromatasas (Figura 31).

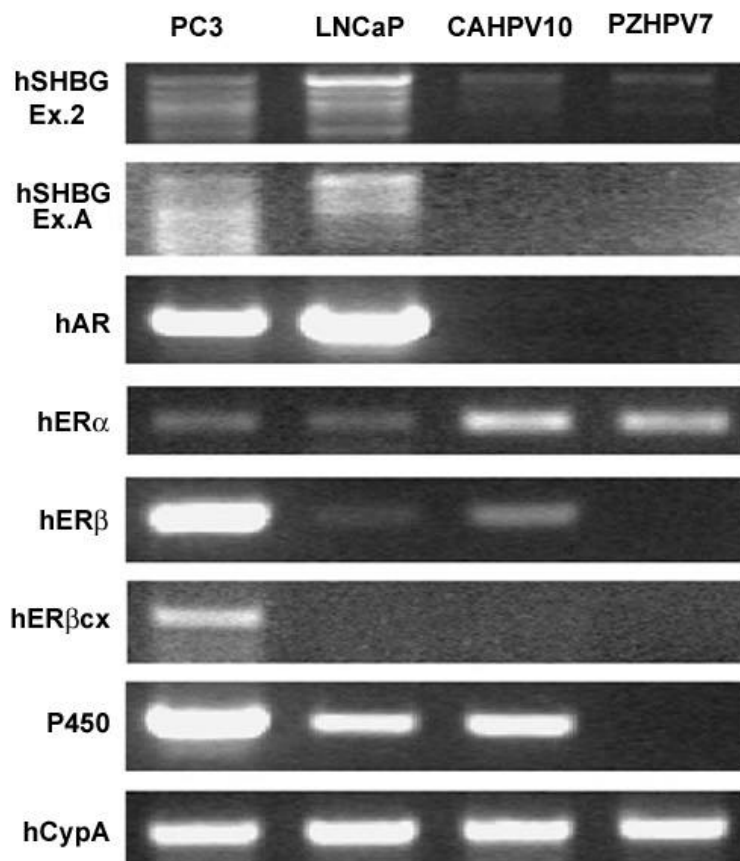


Figura 31. Expressió dels mRNAs de la SHBG/ABP humana (hSHBG), de diferents receptors d'hormones esteroidals sexuals, de P450 aromatas i la Ciclofilina A (CypA) en les línies cel.lulars derivades de pròstata humana: PC3, LNCaP, CAHPV10 i PZHPV10, mitjançant la tècnica de RT-PCR.

Com a resultat de la seqüenciació de les tres bandes expressa a les cèl.lules PC3 i LNCaP es van obtenir aquestes seqüències:

Transcript 1 (majoritari)

TTCAAAGGCTCCCCCGAGTGCTTTTAAATTGACATATGCAGTGATAACCTGCTTTAGCCTCAGGCTCACTCACCCGCCAGACCCT
GGGTAAGCCTTAAGACCCTCAGCTCTGAAAGCTGTTTCTGCAGCTCTTGAGTAGCAAGAGTTGTCTGAGCCCGAGTGGACAGTGG
CTGATTATGGAGAGCAGAGGCCACTGGCTACCTCGGCCTGCTGCTGTTGCTGCTGTTGCTACTACTGCGTCAACCCGCCAGGGAT
GGGCCCTAAGACCTGTTCTCCCAACCCAGAGTGCCACGACCCTTCGGCTGTCCACCTCAGCAATGGCCAGGACAAGAGCCTATCGC
TGTCATGACCTTTGACCTCACCAAGATCACAAAACCTCTCTCTTTGAGGTTCGAACCTGGGACCCAGAGGGAGTGATTTTTTATGGG
GATACCAACCCTAAGGATGACTGGGTTATGCTGGGACTTCGAGACGGCAGGCTGAGATCCAATGCACAATCACTGGGCCAGCTTAC
GGTGGGTGCTGGACCACGNTGGATGATGGGAGATGGCACCAGTGAAGTAAGATGGAGGGGACTCTGTGCTTGTGAGGTGGATTGG
GGGGAT.....TCTTGCCCCACTAGCCTCAGAAGCTGTGATGTAGAATCAAATCCCGGGATATTTCTCCCTCCAGGACTCAGGCAGAATT
CAATCTCGAGACATTTCCCCAGCCTCATGCAGAGCCCTGGCCTTCTTCTTGACCTGGACTCAAGCAGGCAGCAGGCTCAGCCACCTC
CTTGCTCTTGACACCAGAGAACCATCTTGGCTCAGTCTCCACCTCCAAGATCAAAGGTGGTGTGTCTTCTGGGTGGGGCCAGG
GCTGGATCTGCCCTGGTCTTGGGACTCCCTCTTCAGCTGAAGCTGAGTATGTCCAGGGTGGTCTTGGCCAAGGGTGAAGATGAAG
GCCCTTGGCCTGCCTCCCTTAGGCCTGGCTCCCTCCTTAACCTCTGGCCAAGCCTCAAGGGCGTCTTCTCTGGGGCTTTACCAG

GAGAAGACTCTTCCACCTCTTTTTGCCTGAATGGCCTTTGGGCACAAGGTCAGAGGCTGGATGTGGACCAGGCCCTGAACAGAAGCCA
 TGAGATCTGGACTCACAGCTGCCCCAGAGCCAGGCAATGGCACTGACGCTTCCCATTAAGCTCCACCTAAGAACCCCT

Transcript 2 (falta l'exó 7)

TTCAAAGGCTCCCCCGCAGTGCTTTTTAAATTGACATATGCAGTGATAACCTGCTTTAGCCTCAGGCTCACTCACCCGCCAGACCCT
 GGAGTGCCACGACCCCTTCGGCTGTCCACCTCAGCAATGGCCAGGACAAGAGCCTATCGCTGTATGACCTTTGACCTCACCAAGAT
 CACAAAACCTCTCTCTTTGAGGTTGAACTGGGACCCAGAGGGAGTGATTTTTATGGGGATACCAACCTAAGGATGACTGGGTT
 ATGCTGGGACTTCGAGACGGCAGGCTGAGATCCAATGCACAATCACTGGGCCAGCTTACGGTGGGTGCTGGACCACGNTGGATGAT
 GGGAGATGGCACCAGTGAAGTAAGATGGAGGGGACTCTGTGCTTGCTGAGGTGGATTGGGGGAT.....TCTTGCCCCACTAGCCTC
 AGAAGCTGTGATGTAGAATCAAATCCCGGGATATTTCTCCCTCCAGGACTCAGGCAGAATTCAATCTCGAGACATTTCCCCAGCCTCA
 TGCAGAGCCCTGGCCTTCTTCTGGACCTGGACTCAAGCAGGCAGCAGGCTCAGCCACCTCCTTGCTCTTGGACACCAGAGAACCCAT
 CTTGGCTCAGTCTCCACCTCAAGATCAAGAGAAGACTCTTCCACCTCTTTTTGCCTGAATGGCCTTTGGGCACAAGGTCAGAGGCTG
 GATGTGGACCAGGCCCTGAACAGAAGCCATGAGATCTGGACTCACAGCTGCCCCAGAGCCAGGCAATGGCACTGACGCTTCCATT
 AAAGCTCCACCTAAGAACCCCT

Transcript 3 (falten els exons 6 i 7)

TTCAAAGGCTCCCCCGCAGTGCTTTTTAAATTGACATATGCAGTGATAACCTGCTTTAGCCTCAGGCTCACTCACCCGCCAGACCCT
 GGAGTGCCACGACCCCTTCGGCTGTCCACCTCAGCAATGGCCAGGACAAGAGCCTATCGCTGTATGACCTTTGACCTCACCAAGAT
 CACAAAACCTCTCTCTTTGAGGTTGAACTGGGACCCAGAGGGAGTGATTTTTATGGGGATACCAACCTAAGGATGACTGGGTT
 ATGCTGGGACTTCGAGACGGCAGGCTGAGATCCAATGCACAATCACTGGGCCAGCTTACGGTGGGTGCTGGACCACGNTGGATGAT
 GGGAGATGGCACCAGTGAAGTAAGATGGAGGGGACTCTGTGCTTGCTGAGGTGGATTGGGGGAT.....TCTTGCCCCACTAGCCTC
 AGAAGCTGTGATGTAGAATCAAATCCCGGGATATTTCTCCCTCCAGGACTCAGGCAGAATTCAATCTCGAGGAGAAGACTCTTCCACC
 TCTTTTTGCCTGAATGGCCTTTGGGCACAAGGTCAGAGGCTGGATGTGGACCAGGCCCTGAACAGAAGCCATGAGATCTGGACTCACA
 GCTGCCCCAGAGCCAGGCAATGGCACTGACGCTTCCCATTAAGCTCCACCTAAGAACCCCT

Exon A

Part of intron at the end of exon A

Part of intron before exon 1

Exon 1

Exon 2

Exon 3

Exon 4

Exon 5

Exon 6

Exon 7

Exon 8

3' end

IV.1.2. Northern Blot

Es va fer una membrana amb els RNAs procedents de cèl.lules PC3, LNCaP i CAHPV10, es va hibridar amb una sonda específica per SHBG/ABP (exó 2-exó 8). A les cèl.lules PC3 i LNCaP van aparèixer tres bandes similars a les obtingudes per RT-

PCR. A les cèl.lules CAHPV10 s'insinuava la banda més gran. Es va normalitzar amb una sonda específica pel gen S14 humà (Figura 32).

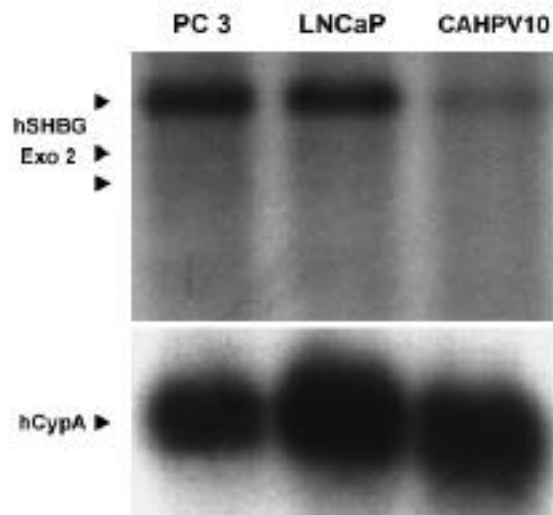


Figura 32. Expressió del RNA de la SHBG/ABP humana (hSHBG) i la Ciclofilina A humana (hCypA) en les línies cel.lulars PC3, LNCaP i CAHPV10, mitjançant *Northern Blot*.

Com es pot observar, la línia cel.lular tumoral PC3, al normalitzar amb l'expressió del gen control, té uns nivells molt més alts dels *transcripts* per la SHBG/ABP humana que les LNCaP.

IV.1.3. Transfecció transitòria i estable

Per tal de confirmar que el cDNA més gran seqüenciat coresponia a un RNA que donava lloc a la SHBG/ABP secretada (igual que la plasmàtica), aquest *transcript* majoritari es va clonar en el vector pCDNA 3.1. Aquest constructe va ser transfectat tant transitòria (TT) com establement (TE) a cèl.lules CHO. Paral.lelament, com a control, es van créixer cèl.lules CHO a les que només se'ls havia introduït lipofectamina (CT). Trancorreguts uns dies de cultiu, es van créixer amb medi sense sèrum. Aquest medi va ser recollit després de tres dies i es va concentrar. Amb aquests medis es va realitzar el DELFIA per tal de detectar la proteïna SHBG/ABP humana. Els resultats van ser els següents:

C - : 1652

CT : 3142

TT : 42308

TE : 38602

Com es pot veure, en el medi de les cèl.lules transfectades, tant transitòriament com de manera estable els nivells de proteïna van ser molt elevats.

IV.1.4. DELFIA

Es va realitzar aquesta tècnica amb medis concentrats provinents de les línies PC3 i PZHPV7 cultivades tant amb medi RPMI com *Keratinocyte*. Com a controls es van utilitzar els medis RPMI i *Keratinocyte* sols. A més a més, es van fer servir extractes proteïcs d'aquestes cèl.lules cultivades amb els dos medis. Els resultats obtinguts van ser:

	Medi Concentrat	PC3		PZHPV7	
		Medi Conc.	Extrac. Prot.	Medi Conc.	Extrac. Prot.
RPMI	2710	3380	3412	1646	2664
<i>Keratinocyte</i>	2160	3056	3620	2086	2508

Com es pot observar a la taula, si restem el soroll de fons que donen els medis, les úniques mostres on es detecta la proteïna SHBG/ABP són les de la línia PC3. Aquesta línia cel.lular secreta proteïna al medi i té proteïna intracel.lular. A més a més el fet de cultivar les cèl.lules amb un altre medi no canvia gaire els resultats, fet que suggeriria que el medi no influencia l'expressió de la SHBG/ABP.

IV.1.5. *Western Blot*

Es va realitzar el *Western Blot* amb extractes de proteïna de les cèl.lules PC3, LNCaP i CAHPV10, a més d'un extracte proteïc de testicle com a controls. Es va fer servir un anticòs anti-SHBG/ABP humana (Figura 33).

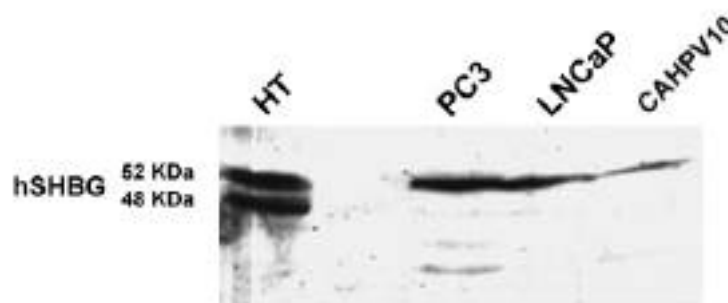


Figura 33. Expressió de la proteïna de la SHBG/ABP humana (hSHBG) en extractes proteïcs de testicle humà (HT) i de les línies cel.lulars PC3, LNCaP i CAHPV10, mitjançant la tècnica de *Western Blot*.

A testicle es van poder detectar les dues formes de SHBG/ABP en el testicle, mentre que a les cèl.lules PC3 i LNCaP es va detectar la banda de 52 Kda i a les CAHPV10 també, però en molta menys quantitat. També es van detectar unes bandes de tamany més petit a l'extracte de les PC3 que podrien correspondre a les formes alternatives de la SHBG/ABP.

Es va realitzar el *Western Blot* amb els mateixos extractes, però utilitzant un anticòs contra la part amino-terminal de l'ER (Figura 34).

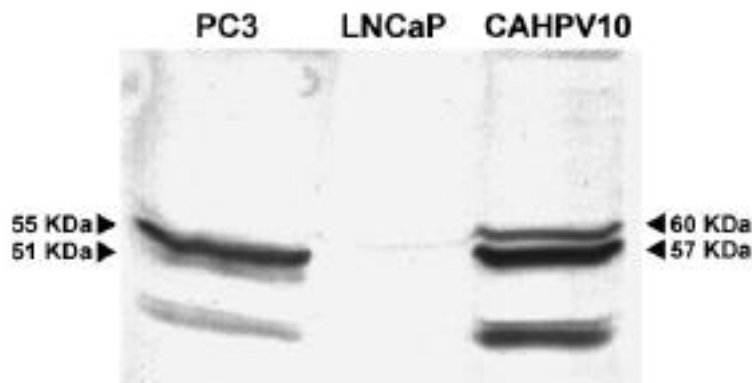


Figura 34. Expressió de la proteïna d'ER humana en les

línies cel·lular PC3, LNCaP i CAHPV10, mitjançant la tècnica de *Western Blot*.

A les cèl·lules PC3 es van poder detectar dues bandes de 51 i 55 KDa que es correspondrien als tamanys descrits per l'ER α (Ogawa, S. et al. 1998). A les cèl·lules CAHPV10 es van detectar dues bandes corresponents a l'ER α de tamanys 57 i 60 KDa (Ogawa, S. et al. 1998).

IV.2. Mostres Humanes

IV.2.1. RT-PCR

Es van utilitzar 2 mostres de pròstata de part perifèrica de donants i 6 mostres tumorals de pacients amb càncer de pròstata, les quals es van amplificar amb els primers específics per la SHBG/ABP (exó 2-exó 8), per l'ER α , pel P450 aromatasa i el S14 com a control. En tots els pacients es van detectar expressió de P450 aromatasa. En 3 dels pacients es va detectar expressió de la SHBG/ABP i ER α . Un quart pacient presentava expressió d'ER α però no presentava expressió de SHBG/ABP (Figura 35).

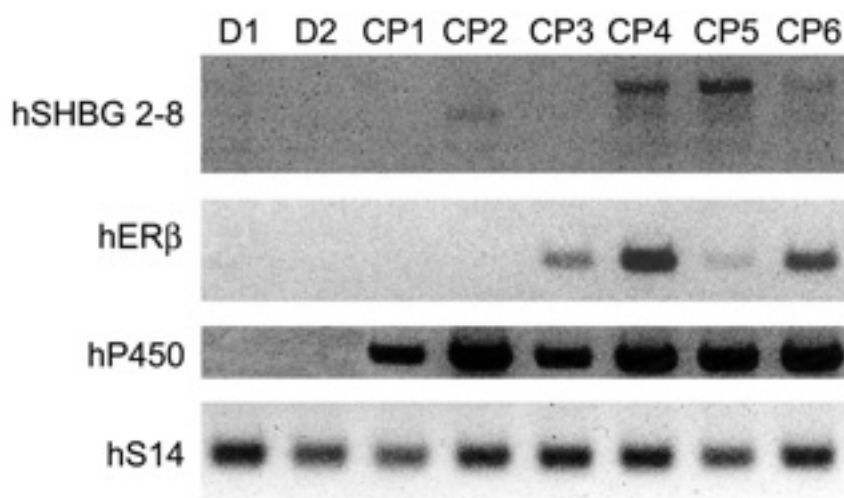


Figura 35. Expressió dels mRNAs de la SHBG/ABP humana (hSHBG), l'ER α humana (hER α), el P450 aromatasa humana (hP450) i el S14 humana (hS14) en mostres de pròstata de donants (D1 i D2) i mostres de càncer de pròstata (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5 i CP6), per la tècnica de RT-PCR.

Les bandes obtingudes d'un dels pacients amplificant la SHBG/ABP van ser clonades i seqüenciades, comprovant-se que eren *transcripts* de SHBG/ABP humana. El *transcript* majoritari era el següent:

Transcript 1 de càncer pròstata 37 CP 32 108U-1184L sencera

CACAAAACCTCTCTCTTTGAGGTTCGAACCTGGGACCCAGAGGGAGTGATTTTTTATGGGGATACCAACCCTAAGGATGACTGGGTT
 ATGCTGGGACTTCGAGACGGCAGGCTGAGATCCAACCTGCACAATCACTGGGCCAGCTTACGGTGGGTGCTGGACCACGNTGGATGAT
 GGGAGATGGCACCAGTGAAGTAAGATGGAGGGGGACTCTGTGCTTGCTGAGGTGGATTGGGGGAT.....TCTTGCCCCACTAGCCTC
 AGAAGCTGTGATGTAGAATCAAATCCCGGATATTTCTCCCTCCAGGACTCAGGCAGAATTCAATCTCGAGACATTTCCCCAGCCTCA
 TGCAGAGCCCTGGCCTTCTTCTTGGACCTGGACTCAAGCAGGCAGCAGGCTCAGCCACCTCCTTGCTCTTGGACACCAGAGAACCCAT
 CTTGGCTCAGTCTCCACCTCCAAGATCAAAGGTGGTGTGTCTTCTGGGTCGGGGCCAGGGCTGGATCTGCCCTGGTCTTGGGACT
 CCCTCTTCACTGAAGCTGAGTATGTCCAGGGTGGTCTTGTAGCCAAGGGTCGAAGATGAAGGCCCTTGCCCTGCCTCCCTTAGGCCTG
 GCTCCCTCCTTAACCTCTGGGCCAAGCCTCAAGGGCGTCTTCTTGGGGCTTTACCAGGAGAAGACTCTTCCACCTCTTTTGCC
 TGAATGGCCTTTGGGCACAAGGTCAGAGGCTGGATGTGGACCAGGCCCTGAACAGAAGCCATGAGATCTGGACTCACAGCTGCCCCCA
 GAGCCAGGCAATGGCACTGACGCTTCCATTAAAGCTCCACCTAAGAACCCT

DISCUSSIÓ

I. LA SHBG/ABP DE RATA I L'ESPERMATOGÈNESI

I.1. Apoptosi de cèl.lules germinals en el ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata

Els resultats obtinguts demostren que la sobreexpressió de la SHBG/ABP de rata al ratolí transgènic provoca problemes de fertilitat, causats per una aturada de l'espermatogènesi durant la primera divisió meiótica i un increment de la degeneració de cèl.lules germinals. Segons les troballes morfològiques i les de la tècnica de TUNEL, en el ratolí transgènic els tipus cel.lulars més afectats són els espermatòcits en fase de paquitè i les cèl.lules en metafase. La presència de DNA fragmentat internucleosomal en gel d'agarosa revela que la mort d'aquetes cèl.lules segueix un mecanisme de mort cel.lular programada o apoptosi.

La mort cel.lular programada ha estat molt ben descrita per criteris morfològics i bioquímics en molts tipus de cèl.lules somàtiques i el mecanisme és comú en totes elles (Kerr, J.F.R. et al. 1984; Wyllie, A.H. et al. 1980). En canvi, la degeneració de cèl.lules germinals presenta fets diferencials depenent de l'estadiatge de maduració al que afecti (Kerr, J.F.R. et al. 1984; Brinkworth, M.H. et al. 1995; Blanco-Rodriguez, J. and Martinez-Garcia, C. 1996). Des del punt de vista morfològic, per exemple, les cèl.lules somàtiques que pateixen apoptosi presenten condensació de la cromatina i una marginació al voltant de la membrana nuclear. En canvi, els espermatòcits en meiosi que degeneren per apoptosi presenten una condensació de la cromatina al voltant dels eixos dels cromosomes, com s'ha demostrat a les rates adultes tractades amb estradiol (Blanco-Rodriguez, J. and Martinez-Garcia, C. 1996). Aquests investigadors suggereixen que la marginació de la cromatina no es pot dur a terme a les cèl.lules meiótiques degut a que els parells de cromosomes estan ancorats a la membrana nuclear per les seves regions telomèriques. Tenint en compte el tamany cel.lular, s'ha demostrat la presència de paquitens que moren per apoptosi i que presenten un augment del tamany cel.lular i una cromatina homogènia i descondensada, tant de manera espontània com en animals tractats amb antagonistes de la GnRH (Brinkworth, M.H. et al. 1995). En el ratolí transgènic, es demostra per la tècnica de TUNEL que la majoria de cèl.lules marcades són espermatòcits en fase de paquitè i cèl.lules en metafase. Quan s'observen aquestes cèl.lules al microscopi òptic algunes d'elles són aparentment normals, però d'altres presenten evidències clares d'estar patint un procés apoptòtic, ja que presenten un increment del tamany cel.lular, una condensació de la cromatina per sobre dels eixos cromosòmics, una disposició anormal de la cromatina i una

pèrdua dels contactes intercel·lulars. En el nostre model també es poden observar cèl·lules que pateixen un augment del tamany cel·lular però que tenen la cromatina descondensada i homogènia.

El marcatge d'espermatòcits en fase de paquitè i cèl·lules en metafase aparentment normals no sembla ser producte de marcatge no específic de la tècnica de TUNEL (Brinkworth, M.H. et al. 1995), ja que s'ha fet servir una concentració molt baixa de Terminal Transferasa (TdT) i aquest marcatge és present però en un número de cèl·lules molt inferior en els ratolins controls.

En quan a l'eliminació de les cèl·lules que degeren, es demostra la presència de cèl·lules picnòtiques en els testicles dels ratolins transgènics, així com la presència de cossos residuals picnòtics. Aquests són indicadors dels últims passos de l'apoptosi i són comuns en la mort cel·lular programada de cèl·lules somàtiques i cèl·lules germinals (Kerr, J.F.R. et al. 1984). En el ratolí transgènic es demostra l'existència de dos mecanismes que eliminen aquestes cèl·lules apoptòtiques. S'ha observat la presència de cossos residuals marcats per la tècnica de TUNEL a la base d'alguns túbuls, fet que demostra la fagocitosi per part de les cèl·lules de Sertoli. Per altra banda es demostra la presència de les cèl·lules germinals marcades a l'epidídim, posant de manifest la seva eliminació per la llum de l'epidídim.

L'evidència bioquímica de l'apoptosi a cèl·lules germinals ha estat demostrada per la fragmentació que pateix el DNA genòmic en fragments de 180 pb (internucleosomals) i múltiples de 180 pb i que s'observa mitjançant l'electroforesi d'aquest DNA en un gel d'agarosa (Billing, H. et al. 1995). Amb l'extracció de DNA genòmic de ratolins transgènics i la seva posterior separació en un gel d'agarosa, s'evidencia l'existència d'una banda de 180 pb i d'altres bandes de tamany més gran múltiples de 180 pb. En els ratolins no transgènics es va poder detectar una banda de 90 pb. Aquesta banda ha estat trobada també en DNA aïllat de rates adultes tractades amb antagonistes de GnRH i rates tractades amb àcid metoxiacètic (Brinkworth, M.H. et al. 1995). Els autors suggereixen que aquests fragments s'originarien per la degeneració de cèl·lules que presenten uns tamany internucleosomals diferents, que serien fruit de la substitució d'algunes histones per altres nucleoproteïnes durant l'espermatogènesi (Brinkworth, M.H. et al. 1995). Tot i que els ratolins no transgènics presenten apoptosi d'algunes espermàtides en els seus testicles creiem que el número de cèl·lules que degeneren no és suficient com per donar lloc a aquesta banda.

I.2. L'apoptosi com una conseqüència del bloqueig meiòtic

Els estudis morfològics han demostrat que els espermatòcits en fase de paquitè i les cèl.lules en metafase dels ratolins transgènics són les cèl.lules més susceptibles a patir o entrar en apoptosi. Per altra banda, l'increment del número d'espermatòcits en paquitè i de cèl.lules en metafase, juntament en la disminució i fins i tot l'absència de cèl.lules en els últims estaditges de maduració, va suggerir l'existència d'una aturada parcial durant la primera divisió meiòtica. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, es va dur a terme l'anàlisi per citometria de flux de les cèl.lules germinals marcades amb iodur de propidi (PI). Aquesta tècnica va permetre detectar que en el ratolí transgènic hi havia una disminució del número de cèl.lules haploids, un augment del número de cèl.lules tetraploids, i l'aparició d'una nova població de cèl.lules germinals amb una ploïdia inferior a la de les cèl.lules tetraploids. Està descrit que les cèl.lules apoptòtiques marcades amb PI es separen de la població de la que provenen, detectant-se per citometria de flux més a baix i cap a l'esquerra, ja que degut a la condensació de la cromatina no incorporen tant PI (Sherwood, S.W. et al. 1995). El pic aneuploid que apareix en els ratolins transgènics més a baix i cap a l'esquerra de la població de cèl.lules tetraploids, representaria a les cèl.lules apoptòtiques d'aquesta població. Tot i que, per citometria de flux, es va observar un pic hipohaploid, el número d'espermàtides rodones marcades per TUNEL era molt baix i no es van veure espermàtides allargades ni espermatozous marcats. És possible que la gran condensació de la cromatina que tenen aquestes cèl.lules no permetés la incorporació de nucleòtids marcats per la tècnica de TUNEL, tenint en compte, a més, la baixa concentració de TdT utilitzada. Aquests resultats ens permeten especular que en el ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata, els espermatòcits en paquitè i les cèl.lules en metafase en molts dels túbuls afectats aturarien la seva diferenciació i degenerarien per apoptosi.

La disminució del número d'espermàtides com a causa dels problemes de fertilitat del ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata ja va ser descrita per Joseph, D.R. et al. (Joseph, D.R. et al. 1997). El mecanisme proposat per aquesta disminució va ser la degeneració d'aquest tipus cel.lular. El fet de que no s'hagi trobat apoptosi en la població haploid per la tècnica de TUNEL, excepte en alguna espermàtida rodona, ens suggereix, en contraposició amb el mecanisme proposat per Joseph, D. et al. (Joseph, D.R. et al. 1997), que la disminució en el número d'espermàtides és més deguda a l'interrupció de l'espermatogènesi que no pas a la degeneració d'espermàtides.

Molts estudis han demostrat l'existència d'apoptosi durant l'espermatogènesi normal (Kerr, J.F.R. et al. 1984; Brinkworth, M.H. et al. 1995; Billing, H. et al. 1995; Tapanainen,

J.S. et al. 1993; Troiano, L. et al. 1994; Callard, G.V. et al. 1995; Henriksen, K. et al. 1995). La pèrdua espontània de cèl.lules germinals té lloc durant la primera divisió mitòtica de les espermatogònies, la divisió meiòtica dels espermatòcits i durant la espermiogènesi. En general, els problemes de fertilitat i les alteracions en l'espermatogènesi observades en diferents línies de ratolins transgènics són produïts per la pèrdua de gens específics que regulen l'espermatogènesi (Huckins, C. 1978; De Rooij, D.G. and Lok, D. 1987; Allan, D.J. et al. 1992). En concret, la profase de la primera divisió meiòtica i el número d'espermatòcits primaris que entren en meiosi està regulat per apoptosi (Stephan, H. et al. 1996). Durant la meiosi, a l'igual que la mitosi, el dany en el DNA es detectat en *checkpoints* específics, proporcionant a la cèl.lula mecanismes de control que provoquen una aturada del cicle cel.lular (Elledge, S.J. 1996; Sassone-Corsi, P. 1997; Braun, R.E. 1988; Odorisio, T. et al. 1988) que condueix finalment a la inestabilitat genòmica i/o mort cel.lular (Rubin, LL. et al. 1993; King, K.L. and Cidlowski, J.A 1995). Gran part del coneixement sobre aquests gens que controlen la meiosi prové de l'estudi del cicle cel.lular en llevats mutats (Elledge, S.J. 1996; Paulovich, A.G. et al. 1997). El desenvolupament de diferents models de ratolins transgènics ha estat útil per a estudiar la regulació de la meiosi en els mamífers (Sassone-Corsi, P. 1997; Reventos, J. and Munell, F. 1997). Entre els gens que la seva mutació o eliminació provoca una aturada meiòtica hi ha BAX, PMS2, CREM, MLH-1, ATM i HSP70 (revisat en Sassone-Corsi, P. 1997; Six, D.J. et al. 1996). Un fenotip similar s'ha descrit en la sobreexpressió d'alguns gens, com el c-myc (Kodaira, K. et al. 1996). Totes les proteïnes anteriors han estat localitzades a les cèl.lules germinals entrant en meiosi en el ratolí normal. El cas de la SHBG/ABP, tot i que no s'ha trobat expressió en espermatòcits primaris, sí que s'ha demostrat la seva internalització a les cèl.lules germinals de rata i mono (Gerard, H et al. 1994; Gerard, A. et al. 1992). És possible que la quantitat de SHBG/ABP en el ratolí normal sigui molt baixa per ser detectada per immunohistoquímica, però que el ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata tingui una quantitat suficient com per ser detectada. En el ratolí transgènic s'ha detectat per immunohistoquímica la presència i acumulació de SHBG/ABP de rata en els espermatòcits en fase de paquitè i en les cèl.lules en metafase, que són les mateixes cèl.lules que s'acumulen en els túbuls que presenten l'aturada de l'espermatogènesi (Esteban, C. et al. 1997). Això suggereix que l'excés de SHBG/ABP causaria aquesta aturada en meiosi i degeneració cel.lular. Alternativament, degut a que s'ha observat un augment de la SHBG/ABP endògena del ratolí, podria ser que la SHBG/ABP de rata no fos

activa en el ratolí i que antagonitzés amb la SHBG/ABP del ratolí, el que voldria dir que el responsable de l'interrupció de l'espermatogènesi seria la falta de SHBG/ABP i no l'excés.

Tot i que en aquest estudi només s'ha analitzat una única línia de ratolins transgènics, hi ha diferents evidències que donen suport al fet de que és la sobreexpressió de la SHBG/ABP de rata la causant del desordre en l'espermatogènesi i que aquest no es causat per una mutació insercional. En primer lloc, està demostrat que una altra línia de ratolins per la SHBG/ABP de rata té una fertilitat reduïda, i que un dels *founders* no va deixar descendència ja que no era fèrtil (Reventos, J. et al. 1993; Larriba, S. et al. 1995). En segon lloc, el grau d'apoptosi que presenten les cèl.lules germinals durant la meiosi ha estat correlacionat amb la quantitat de mRNA de SHBG/ABP de rata que presenten els ratolins heterozigots. En tercer lloc, els nivells de SHBG/ABP endògena presenten un patró similar als nivells de SHBG/ABP de rata i el grau d'apoptosi de cèl.lules germinals. En quart lloc, la SHBG/ABP de rata s'acumula en els espermatòcits en fase de paquitè en molts dels túbuls afectats.

I.3. Mecanisme d'acció de la SHBG/ABP de rata durant l'espermatogènesi

En els últims anys s'ha demostrat que una falta de testosterona produeix apoptosi a espermatòcits en fase de paquitè, a espermàtides rodones i allargades (Henriksen, K. et al. 1995; Sharpe, R.M. et al. 1988). Per tant una disminució en la testosterona lliure podria explicar la mort dels paquitens i les espermàtides rodones que té lloc en el ratolí transgènic. No es coneix el mecanisme pel qual aquesta deprivació d'andrògens provoca la mort cel.lular programada d'aquestes cèl.lules, ja que aquests tipus cel.lulars no expressen receptor d'andrògens (Vornberger, W. et al. 1994). El fet de (a) que no s'observin canvis en els nivells de testosterona en plasma total ni en extractes del testicle dels ratolins transgènics per la SHBG/ABP de rata (Joseph, D.R. et al. 1997), (b) que no s'hagin trobat diferències en els nivells d'expressió d'AR per RT-PCR en els testicles dels ratolins no transgènics i transgènics, (c) que a nivell immunohistoquímic s'hagi vist marcatge únicament a nivell d'interstici a les cèl.lules de Leydig i dins dels túbuls a les cèl.lules de Sertoli, com ja estava descrit prèviament (Bremer, W.J. et al. 1994; Vornberger, W. et al. 1994), i que no s'han observat diferències entre els ratolins no transgènics i transgènics, fa pensar que els problemes de fertilitat i la mort cel.lular programada que pateixen les cèl.lules germinals del ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata sigui deguda per a una falta de testosterona en el testicle.

En els últims anys s'ha demostrat que els espermatòcits primaris expressen P450 aromatas i ER (Levallet et al, 1998; Saunders et al., 1998). Si la SHBG/ABP transporta la testosterona a les cèl.lules germinals de l'animal transgènic i aquesta testosterona es converteix en estrògens en els paquitens, existiria la possibilitat de que els nivells d'estrògens intratesticulars estiguessin augmentats en els transgènics. Ja que s'ha demostrat que l'administració d'estradiol provoca apoptosi a les cèl.lules germinals (Blanco Rodríguez y Martínez-García, 1996), aquest mecanisme podria contribuir en el fenotip testicular del ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata.

Per altra banda, diverses dades suggereixen que els estrògens tenen un paper en la inducció de la progressió de la meiosi. Per exemple, s'ha demostrat recentment que l'administració d'estradiol aconseguix normalitzar completament l'espermatogènesi del ratolí hipogonadal (hpg) que pateix una parada espermatogènica a nivell de paquitè per l'absència congènita de gonadotrofines (Ebling et al., 2000). Els autors suggereixen que l'estradiol actuaria augmentant els nivells de FSH. De tota manera, també s'ha demostrat la capacitat de l'estradiol d'inhibir l'apoptosi de les cèl.lules germinals induïda *in vitro* com a conseqüència de la incubació de segments de túbuls seminífers humans sense factors de supervivència (Pentikainen et al., 2000), i, en aquest cas, el paper de l'estradiol no pot anar mitjançant la FSH. Encara que no s'hagi demostrat que la SHBG/ABP testicular uneixi estradiol al testicle, el fet de que l'estructura de la proteïna sigui la mateixa que la plasmàtica fa molt possible aquesta hipòtesi. Si aquest és el cas, seria possible que, en l'animal transgènic per la SHBG/ABP de rata, l'excés de SHBG/ABP comportés una reducció dels nivells d'estradiol lliures, i si l'estradiol es necessari per la progressió de la meiosi, la falta d'estradiol podria ser la causa del bloqueig meiòtic que s'observa en aquest model animal. Per testar aquesta hipòtesi, es van mesurar, en el ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata, els nivells de RNA missatger d'ER α i d'ER β , de P450 aromatas, del receptor de la FSH, de l'enzim Star i de la Transferrina com a gen diana de FSH a cèl.lules de Sertoli, tan a testicle total com a diferents tipus cel.lulars testiculars.

Pel que fa a l'ER β , s'ha descrit la seva expressió al nucli de les cèl.lules de Sertoli, de les espermatogònies i d'espermatòcits en fase de paquitè així com al citoplasma d'espermatòcits entrants a la segona divisió meiòtica (Pelletier, G. et al. 2000). Altres autors han trobat l'ER β a espermatòcits en meiosi i espermàtides allargades (Pentikainen, V. et al. 2000). Estudis més detallats han detectat expressió d'ER β en espermatòcits en fase de paquitè en els estadiatges VII-XIV i a espermàtides rodones en els estadiatges I-

VIII (Ans, M.M. et al. 1999). La generació del ratolí *knock-out* per ER no ens ha ajudat a esbrinar la possible funció d'aquest receptor a l'espermatogènesi ja que no s'han realitzat estudis exhaustius a nivell del testicle, tot i que no sembla que tingui problemes de fertilitat (Krege, J.H. et al. 1998). Els nivells d'ER al ratolí transgènic homozigot per la SHBG/ABP de rata són elevats tant si es mira a testicle total com a cèl.lules germinals aïllades. Per tal de confirmar els nivells elevats d'expressió d'aquest receptor es va realitzar el *Northern Blot*, i es van detectar dos *transcripts*. El més petit era el que correspon a l'ER estava augmentat respecte els ratolins no transgènics. Així mateix, els nivells de proteïna d'ER en el testicle del ratolí transgènic homozigot també es van trobar elevats per *Western Blot*. Mitjançant aquesta tècnica es van detectar dues bandes corresponents a dos tamanys de proteïna de 55 KDa i 80 KDa, tal i com havien demostrat altres autors (Lavallet, J. et al. 1998). Les dues bandes van resultar específiques, ja que no es van detectar quan es van realitzar els assajos de bloqueig amb el pèptid corresponent. Al realitzar la immunohistoquímica per l'ER en seccions testiculars del ratolí transgènic i no transgènic es va poder detectar marcatge a les cèl.lules de Sertoli i espermàtides allargades com ja estava descrit. Però en el ratolí transgènic també es va evidenciar un marcatge intens en determinats túbuls, a les cèl.lules germinals amb característiques morfològiques d'apoptosi. Mitjançant la microscopia confocal es va poder localitzar la proteïna de l'ER en el citoplasma de les cèl.lules marcades per TUNEL. Aquestes dades suggereixen que l'ER juga un paper important en l'apoptosi d'aquestes cèl.lules germinals del ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata, ja sigui per que el seu acúmulo en el citoplasma d'aquestes cèl.lules posi de manifest la manca d'estrògens i la impossibilitat de seguir progressant en l'espermatogènesi, el que farà que entrin en el programa de mort cel.lular programada o apoptosi, o bé que tingui un paper actiu a citoplasma, diferent del nuclear i que participi en el desencadenament de la mort cel.lular programada.

Els nivells elevats de Star i de P450 aromatasa al testicle total dels ratolins transgènics, juntament a la prèviament demostrada hiperplàsia de les cèl.lules de Leydig (Esteban et al., 1997 b), suggereix que la esteroidogènesi és molt activa en aquest animals i que part de la testosterona resultant es convertida a estradiol. Aquestes dades recolzen la hipòtesi de que els estrògens jugarien un paper en les alteracions testiculars d'aquests animals. Per altra banda, el fet de que els nivells d'expressió del receptor de FSH estiguin augmentats i que els nivells de dos gens diana d'aquest receptor a les cèl.lules de Sertoli com són la transferrina i la Star (Gregory, C.W. and DePhilip, R.M. 1998) estiguin

disminuïts, fa pensar que els nivells de FSH estarien disminuïts en aquests transgènics. Si tal com s'ha comentat, l'estradiol és capaç de regular l'expressió de FSH (Ebbeling et al., 2000), les dades obtingudes en el ratolí transgènic recolzarien el fet de que l'estradiol actiu (lliure) estaria disminuït i aquesta podria ser la causa de la parada meiòtica i de la inducció d'apoptosi.

En quan al paper d'ER α durant l'espermatogènesi, s'ha descrit que el ratolí *knock-out* per aquest receptor és infèrtil i l'anàlisi del seu esperma mostra una disminució del número d'espermatozous a l'epidídim, amb una concomitant reducció de la motilitat i la capacitat de fertilització (Eddy et al., 1996). Degut a que les cèl.lules germinals d'aquest ratolí es desenvolupen normalment quan es transplanten al ratolí salvatge i a la dilatació evident de la llum dels túbuls seminífers, es creu que l'alteració és deguda a la falta de reabsorció de líquids en el túbuls efferents (Eddy et al., 1996; Mahato et al., 2000). En aquest ratolí, a més, s'ha demostrat un augment dels nivells de LH i testoterona plasmàtica junt a signes d'hiperplàsia de cèl.lules de Leydig i uns nivells normals de FSH (Eddy et al., 1996; Lindzey et al., 1998). Per altra banda, en quan a l'expressió d'ER α en el testicle normal, la majoria d'autors coincideixen en que estaria confinada a l'interstici testicular, concretament a les cèl.lules de Leydig (Pelletier, G. et al. 2000), encara que també s'ha descrit la seva expressió a espermatòcits en meiosi i a espermàtides allargades (Pentikainen, V. et al. 2000). Als testicles del ratolí homozigot per la SHBG/ABP de rata es va trobar que els nivells d'expressió d'aquest receptor per RT-PCR estaven molt disminuïts, el que va suggerir que aquesta fos la causa de la disminució de la fertilitat. Però la demostració ja esmentada de que les cèl.lules germinals del ratolí *knock-out* d'ER α no necessiten aquest receptor per al seu desenvolupament i posterior funció de fertilització (Mahato et al. 2000), juntament amb el fet de que en el ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata no es va poder amplificar l'ER α procedent de les cèl.lules germinals aïllades i de que no s'observessin diferències a nivell immunohistoquímic, van fer descartar aquesta hipòtesi.

II. LA SHBG/ABP HUMANA I L'ESPERMATOGÈNESI

Tal i com s'ha explicat a la introducció, la SHBG/ABP és la proteïna secretada encarregada de transportar els diferents esteroides per la circulació i a l'humà es secretada pel fetge mentre que a la rata i ratolí és secretada per la cèl.lula de Sertoli. La funció de l'SHBG/ABP a rata i ratolí a nivell testicular ha estat àmpliament estudiada i s'ha demostrat que aquesta proteïna és l'encarregada de portar la testosterona fins a l'epidídim per a la correcta maduració dels espermatozous i que una petita part de l'SHBG/ABP va a la circulació per a transportar esteroides.

II.1. Ratolí transgènic per a la SHBG/ABP humana

Per tal d'aprofundir en el coneixement de les accions de la SHBG/ABP humana es van generar els dos tipus de ratolins transgènics per la SHBG/ABP humana. L'estudi d'aquests models ha posat en evidència que *transcripts* de la SHBG/ABP humana que contenen l'exò 1 són molt abundants al ronyó i al fetge de les dues línies, shbg4 i shbg11. Mentre que els *transcripts* alternatius de la SHBG/ABP humana, que contenen l'exò A, únicament s'expressen en el testicle en els ratolins transgènics shbg11. La possibilitat d'aïllar les cèl.lules germinals i cèl.lules de Sertoli del testicle d'aquests ratolins i de relitzar *Northern Blots*, ha permès evidenciar que són les cèl.lules germinals les que expressen els *transcripts* de la SHBG/ABP alternativa. Aquests resultats han estat confirmats gràcies a les tècniques d'immunohistoquímica realitzades en els testicles dels ratolins transgènics de la línia shbg11. S'ha localitzat la proteïna a l'interior de les cèl.lules germinals i més concretament a nivell de l'acrosoma. La proteïna comença a aparèixer a les cèl.lules germinals a l'estadiatge VII, que es el moment en que s'inicia l'etapa d'elongació de les cèl.lules germinals i quan es comença a formar l'acrosoma. La proteïna és visible durant tota l'etapa d'elongació fins l'estadiatge XII. La proteïna encara es detectable en els espermatozous tant en els estadiatges previs a l'alliberació a la llum del túbul com a nivell de l'epidídim. Per tècniques d'immunohistoquímica realitzades en extensions d'esperma epididimari dels ratolins transgènics de la línia shbg11 també s'ha detectat la presència de la proteïna a l'acrosoma dels espermatozous. Finalment, fent servir la tècnica de DELFIA en extractes de cèl.lules germinals del ratolí transgènic shbg11 també s'ha pogut detectar la presència de la proteïna SHBG/ABP en aquestes cèl.lules. Les dades obtingudes en la línia de ratolins transgènics shbg11 ha permès conèixer que la

SHBG/ABP humana s'expressa a les cèl.lules germinals del testicle i no a les cèl.lules de Sertoli com està descrit en la rata o en el ratolí. A més a més, els *transcripts* de la SHBG/ABP que s'expressen són els *transcripts* alternatius.

II.2. La SHBG/ABP en el testicle humà

La possibilitat de treballar amb mostres humanes de testicle i espermatozous, ha permès conèixer que els resultats obtinguts en el ratolí transgènic de la línia shbg11 són extrapolables a l'humà. A nivell del testicle humà normal s'ha pogut detectar l'expressió del mRNA de la SHBG/ABP. En canvi, no s'ha pogut detectar la seva expressió en testicles patològics de pacients en els que només hi havia cèl.lules de Sertoli. Aquests resultats suggereixen que són les cèl.lules germinals les que expressen aquesta SHBG/ABP i no les cèl.lules de Sertoli. Aquest fet s'ha pogut confirmar amb tècniques d'immunohistoquímica en seccions testicular normals, ja que s'ha detectat la presència de la proteïna en els espermatozous. A més a més, per la tècnica de *Western Blot* també s'ha detectat la proteïna SHBG/ABP en extractes protèics de testicle total i d'espermatozous. L'especificitat d'aquestes bandes ha estat confirmada gràcies al assajos de bloqueig realitzats amb proteïna recombinant humana purificada. Per la tècnica de DELFIA en extractes de testicle total normal i d'espermatozous s'ha confirmat l'existència de la proteïna SHBG/ABP.

S'han utilitzat també mostres d'epidídim, vesícula seminal i espermatozous humans. A nivell d'epidídim i vesícula seminal no s'ha pogut detectar l'expressió del mRNA de la SHBG/ABP, però en canvi per les tècniques de *Western Blot* i DELFIA, s'ha detectat la presència de la proteïna. Si no s'està produint en aquests teixits, el més probable és que o bé es capti de la circulació sanguínia, o bé que procedeixi del testicle.

III. LA SHBG/ABP HUMANA I LA PRÒSTATA

Durant aquests últims anys, s'han aportat evidències de l'existència d'un receptor de membrana plasmàtica per a la SHBG/ABP i de que la transducció de la senyal que activaria aquest receptor estaria acoplada a proteïna G (Nakhla, A.M. et al. 1999; Rosner, W. et al. 1999). Per tal d'esbrinar si realment existia aquest receptor o no, vàrem posar a punt la tècnica de doble híbrid en llevats, utilitzant una llibreria de pròstata humana. La comprovació inicial de l'expressió de mRNA de SHBG/ABP a la llibreria va donar lloc,

sorprenentment, a la troballa de diversos *transcripts* de SHBG/ABP a la pròstata humana. Aquests resultats han desencadenat tot el treball que s'ha realitzat a la pròstata.

III.1. Línies cel.lulars de pròstata humana

Durant els últims anys diversos estudis han intentat determinar els efectes de la SHBG/ABP en diverses línies cel.lulars de pròstata, ja sigui per comprovar els seus efectes sobre el creixement cel.lular (Damass, D.A. et al. 1991; Nakhla, A.M. et al. 1996) o per evidenciar l'activació de senyals com a conseqüència de la seva interacció amb el seu hipotètic receptor de membrana (Nakhla, A.M. et al. 1999; Rosner, W. et al. 1999).

El treball presentat en aquesta tesi s'ha realitzat amb línies cel.lulars de pròstata humana tumorals i normals. Utilitzant les tècniques de RT-PCR i *Northern Blot* s'ha pogut observar que les dues línies tumorogèniques expressen tres *transcripts* de la SHBG/ABP. L'amplificació d'aquests tres *transcripts* amb l'exó A demostra que són *transcripts* alternatius. La seqüenciació ha demostrat que el *transcript* majoritari conté tant l'exó A com l'exó 1, el que suggereix que aquest *transcript* donaria lloc a una proteïna que seria secretada, mentre que els altres dos *transcripts*, en els quals no hi ha exó 1, donarien lloc a unes proteïnes que serien intracel.lulars. S'ha pogut detectar la presència de la proteïna SHBG/ABP a nivell de les cèl.lules PC3 i LNCaP. A la línia CAHPV10 també s'ha detectat, però en menys quantitat. Cal dir que aquesta línia cel.lular és considerada com normal ja que, tot i que prové d'un adenocarcinoma de pròstata no es tumorigènica a ratolins *nude*. La transfecció tant estable com transitòria del *transcript* majoritari en cèl.lules CHO, i la posterior realització del DELFIA utilitzant els medis d'aquestes cèl.lules, així com la utilització de medi provinent de les cèl.lules PC3 i LNCaP, ha permès demostrar que aquestes línies tumorals estan produint SHBG/ABP i l'estan secretant al medi.

El fet de que les dues línies tumorals utilitzin per créixer el medi RPMI i les dues línies normals el medi *Keratinocyte* va fer pensar que algun factor del medi podia induir o inhibir l'expressió de la SHBG/ABP a les cèl.lules. Analitzant els medis i extractes proteïcs de les cèl.lules PC3 i PZHPV7 cultivades en els medis RPMI i *Keratinocyte*, mitjançant la tècnica de DELFIA s'ha comprovat que la inducció o inhibició de l'expressió de la SHBG/ABP no està influenciada pel medi de cultiu.

Per una altra banda s'han analitzat els nivells d'expressió dels diferents receptors d'esteroids i de P450 en les quatre línies cel.lulars, per tal de veure si existia alguna

diferència d'expressió entre les línies cel.lulars derivades de pròstata normal i les línies cel.lulars tumoral LNCaP (depenent d'andrògens) i PC3 (independent d'andrògens).

Pel que fa a l'AR, mentre que les dues línies cel.lulars normals no expressaven nivells detectables del receptor, les línies cel.lulars tumorals si l'expressaven. Aquestes dades suggereixen que els andrògens a través del seu receptor juguen un paper en el creixement de les línies cel.lulars LNCaP i PC3. S'ha demostrat que els andrògens participen en el creixement i la producció de secrecions a nivell de la pròstata (Riegman, P.H.J. et al. 1991; Cuhna, G.R. et al. 1996; Liu, X.M. et al. 1993; Virkkunen, P. et al. 1994), tot i que cal tenir en compte que les PC3 són androgen independents.

Els nivells d'expressió de P450 es van trobar molt elevats a les PC3, encara que també es va trobar expressió a les LNCaP i a les CAHPV10. L'activitat incrementada d'aquest enzim permetria a aquestes cèl.lules produir per aromatització dels andrògens uns nivells considerables d'estradiol. S'ha demostrat que els estrògens també incrementen el creixement de les cèl.lules de pròstata en cultiu (Nakhla, A.M. et al. 1996).

L'expressió d'ER α va ser detectable a les quatre línies, tot i estar molt més expressat a les línies cel.lulars normals. Altres autors també han detectat nivells d'expressió d'ER α a les línies cel.lulars tumorals LNCaP i PC3 (Lau, K.M. et al. 2000).

Es van detectar uns nivells molt alts d'expressió d'ER α a la línia cel.lular PC3 i baixos a la línia cel.lular CAHPV10. La impossibilitat d'amplificar el *transcript* utilitzant un *lower primer* específic de l'extrem carboxi-terminal, va fer pensar que es podia estar expressant una isoforma amb una regió carboxi-terminal diferent. L'ER α que s'expressava era l'isoforma α que té la regió carboxi-terminal diferent. Aquest fet va ser confirmat per la tècnica de *Western Blot* amb extractes proteïcs de les línies cel.lulars PC3, LNCaP i CAHPV10, ja que utilitzant un anticòs contra la part amino-terminal de l'ER α es van poder detectar a la línia cel.lular tumoral PC3 dues bandes corresponents al ER α α , del tamany ja descrit (Ogawa, S. et al. 1998), i a la línia cel.lular normal CAHPV10 dues bandes corresponents a l'ER α . Aquests tamanys de proteïna per l'ER α α i per l'ER α han estat detectats per la tècnica de *Western Blot* per altres autors (Ogawa, S. et al. 1998). S'ha demostrat que aquest ER α α no és capaç d'unir-se a l'element de resposta a estrògens i que heterodimeritza amb alta afinitat amb l'ER α , amb el que el ER α α actuaria de dominant negatiu de l'activitat de l'ER α (Ogawa, S. et al. 1998). El fet de que la línia cel.lular tumoral PC3 expressi nivells alts de P450 aromatasa, nivells baixos de l'ER α i nivells alts

de l'ER α suggereix que aquests factors juguen un paper important en el creixement cel·lular amb independència d'andrògens.

III.2. Mostres de pròstata humanes

En mostres de pròstata humanes de donants i pacients amb càncer de pròstata s'ha estudiat per RT-PCR l'expressió de SHBG/ABP, d'ER α , de P450 aromatasa i de S14, el que ha permès observar que el teixit normal prostàtic no expressa cap *transcript* de SHBG/ABP i en canvi, el teixit tumoral expressa tres *transcripts* diferents de SHBG/ABP. També s'ha pogut comprovar per aquesta tècnica que tots els pacients amb càncer de pròstata expressen uns nivells molt alts de P450 aromatasa i que els pacients en que s'ha detectat l'expressió de la SHBG/ABP expressen també l'ER α .

Els patrons d'expressió dels diferents receptors i els tipus de *transcripts* de SHBG/ABP expressats en les línies cel·lulars tumorals i en les mostres humanes indiquen que les línies LNCaP i PC3 són un bon model per estudiar els efectes de la SHBG/ABP al càncer de pròstata humana.

CONCLUSIONS

1. En el ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata, la sobreexpressió d'aquesta proteïna en el testicle provoca una aturada parcial de la primera divisió meiótica de les cèl.lules germinals.
2. En el ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata, la sobreexpressió d'aquesta proteïna en el testicle provoca la mort per apoptosi de les cèl.lules germinals. Els tipus cel.lulars majoritaris que es moren són espermatòcits en fase de paquitè i metafase.
3. Les cèl.lules germinals del ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata que moren per apoptosi sobreexpressen el receptor d'estrògens beta.
4. En la línia de ratolins transgènics per la SHBG/ABP humana, el mRNA de la SHBG/ABP alternativa s'expressa a les cèl.lules germinals del testicle. La proteïna a que dóna lloc es localitza a l'acrosoma dels espermatozous.
5. El testicle humà expressa el mRNA de la SHBG/ABP.
6. En el testicle humà, les cèl.lules germinals contenen la proteïna SHBG/ABP humana.
7. Els espermatozous humans contenen la proteïna SHBG/ABP humana.
8. En els testicles de pacients que només contenen cèl.lules de Sertoli no s'expressa el mRNA de la SHBG/ABP humana.
9. Les línies tumorals derivades de cèl.lules epitelials de pròstata humana PC3 i LNCaP, sobreexpressen tres mRNAs de la SHBG/ABP: un majoritari que conté l'exó A i l'exó 1, i dos minoritaris que contenen l'exó A.
10. El *transcript* majoritari que expressen les línies tumorals PC3 i LNCaP dóna lloc a la proteïna SHBG/ABP que és secretada.

11. La línia tumoral de cèl.lules epitelials de pròstata humana hormono-independent PC3 perd l'expressió del mRNA i de la proteïna del receptor d'estrògens beta, sobreexpressa el mRNA i la proteïna de la isorforma cx del receptor d'estrògens beta, i sobreexpressa el mRNA de la P450 aromatasa.

12. Els pacients amb càncer de pròstata sobreexpressen el mRNA de la SHBG/ABP, juntament amb el mRNA del receptor d'estrògens beta i P450.

BIBLIOGRAFIA

1. Adachi, M. et al. 1995 **Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver.** Nat. Genet. 11, 294-300.
2. Adams, J.M. et al. 1998 **The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.** Science 281, 1322-6.
3. Allan, D.J. et al. 1987 **Cell death in spermatogenesis.** Oxford University Press 229-58.
4. Allan, D.J. et al. 1992 **Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat.** Cell Prolif 25:241-250
5. Anderson, D.C. 1974 **Sex hormone-binding globulin.** Clin Endocrinol. 3, 69-96.
6. Ans, M.M. et al. 1999 **Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis.** Endocrinology 141, 478-83.
7. Aumüller, G. 1989 **Morphologic and regulatory aspects of prostatic function.** Anat. Embryol. 179, 519-31.
8. Aumüller, G. 1992 **Bening prostatic hyperplasia: mechanisms and hypotheses.** Urologe A 31, 159-65.
9. Aumüller, G. 1993 **Current aspects of prostatic structure an function.** Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 7, 1-18.
10. Ayala, A.G. et al. 1989 **The prostatic capsule: Does it exist? Its importance in the staining and treatment of prostatic carcinoma.** Am. J Surg. Pathol. 14, 240-7.
11. Baker, S.M. et al. 1996 **Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over.** Nat. Genet. 13, 336-42.
12. Bardin, C. W. et al. 1988 **The Sertoli cell.** In: **The Physiology of Reproduction.** Raven Press, NY., pp 933-74.
13. Bartke, A. et al. 1980 **Effects of photoperiod on pituitary and testicular function in seasonally breeding species. In: Functional correlates of hormones receptors in reproduction.** Elsevier/North Holland, N. Y. 171-86.
14. Becchis, M. et al. 1996 **Distribution of immunoreactive androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in tissues of the fetal rat.** Steroids 61, 392-400.
15. Becker, R.R. and Iles, D.J. 1985 **Developmental pattern of androgen-binding protein secretion during the critical period of sexual diferentiation.** Arch. Androl. 14, 107-14.

16. Benz, M. 1993 **Morphological classification and comparison of the different types of stromal nodules in benign prostatic hyperplasia.** *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 77, 111-6.
17. Berndson, W.E. et al. 1987 **The numbers of Sertoli cell in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis.** *Biol. Reprod.* 37, 60-7.
18. Berube, D. et al. 1990 **Localization of the human sex hormone binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13).** *Cytogenet. Cell Genet.* 54, 65-7.
19. Billig, H. et al. 1995 **Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubules stages.** *Endocrinology* 136, 5-12.
20. Blacklock, N.J. 1949 **Anatomical factors in prostatitis.** *Br. J Urol.* 46, 47-54.
21. Blanco-Rodriguez, J. and Martinez-Garcia, C. 1996 **Induction of apoptotic cell death in seminiferous tubule of the adult rat testis: assessment of the germ cell types that exhibit the ability to enter apoptosis after hormone suppression by oestradiol treatment.** *Int. J Androl.* 19, 237-47.
22. Blanquier, J.A. 1971 **Selective uptake and metabolism of androgens by rat epididymis. The presence of a cytoplasmic receptor.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 1076-82.
23. Bocchinfuso, W.P. and Hammond G.L. 1994 **Steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin partially overlap: steroids and Ca²⁺ stabilize dimer formation.** *Biochemistry* 33, 10622-29.
24. Bonkhoff, H. and Remberger, K. 1993 **Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate.** *Virchows Arch A* 422, 35-8.
25. Bonkhoff, H. and Remberger, K. 1996 **Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostate growth: a stem cell model.** *Prostate* 28, 98-106.
26. Bostwick, D.G. and Brawer, M.K. 1987 **Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer.** *Cancer* 59, 788-94.
27. Bostwick, D.G. et al. 1993 **Atypical adenomatous hyperplasia of prostate: morphologic criteria for its distinction from well-differentiated carcinoma.** *Hum. Pathol.* 24, 819-32.

28. Braun, R.E. 1998 **Every sperm is sacred - or is it?** *Nature Genet* 18:202-204
29. Brawer, M.K. et al. 1985 **Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate.** *Cancer Res.* 45, 3663-7.
30. Brinkworth, M.H. et al. 1995 **Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats.** *J Reprod Fertil* 105:25-33
31. Burgoyne, P.S. et al. 1984 **Meiotic pairing and gametogenic failure.** *Symp. Soc. Exp. Biol.* 38, 349-62.
32. Callard, G.V. et al. JM 1995 **Biochemical analysis of programmed cell death during premeiotic stages of spermatogenesis in vivo and in vitro.** *Dev Genet* 16:140-147
33. Can, A. et al. 2000 **DES-induced cell cycle delay and meiotic spindle disruption in mouse oocytes during in vitro maturation.** *Mol. Hum. Reprod.* 6, 154-62.
34. Carreau, S. 1986 **L'androgen binding protein (ABP) chez le rat, le bélier, le taureau et l'homme: analyse comparée.** *Colloq.-Inst Natl Sante Rech Med* 149, 293-303.
35. Casey, P.J. and Gilman, A.G. 1988 **G Protein involvement in receptor-effector coupling.** *J. Biol. Chem.* 263, 2577-80.
36. Cleary, K.R. et al. 1983 **Basal cell hyperplasia of the prostate.** *Am. J Clin. Pathol.* 80, 850-4.
37. Clermont, Y. and Perey, B. 1957 **The stages of the cycle of seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA-Schiff-hematoxylin and hematoxylin-eosin stained sections.** *Rev. Canad. Biol.* 16, 451-62.
38. Clermont, Y. et al. 1959 **Durée du cycle de l'épithélium séminal du rat.** *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 48, 37-56.
39. Clermont, Y. 1963 **The cycle of the seminiferous epithelium in man.** *Am. J. Anat.* 112, 35-51.
40. Clermont, Y. and Harvey, S.C. 1965 **Duration of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-treated albino rats.** *Endocrinology.* 76, 80-9.
41. Conti, M. et al. 1991 **Hormonal regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases.** *Endocr. Rev.* 12, 218-34.
42. Cooke, P.S. et al. 1991 **Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism.** *Endocrinology* 129, 244-48.

43. Corvol, P. and Bardin, C.W. 1973 **Species distribution of testosterone-binding globulin.** Biol. Reprod. 8, 277-82.
44. Cunninham, G.R. and Huckins, C. 1979 **Persistence of complete spermatogenesis in the presence of low intratesticular concentrations of testosterone.** Endocrinology 105, 177-86.
45. Chang, C.F. and Lee, Y.H. 1992 **Purification of sex steroid-binding protein from common carp plasma.** Comp. Biochem. Physiol. B 587-90.
46. Chatelain, P.G. et al. 1991 **Growth hormone and insulin like growth factor I treatment increase testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth hormone deficient dwarf mice.** Endocrinology 128, 1857-62.
47. Chemes, H.E. et al. 1979.a **The role of gonadotropins and testosterone on initiation of spermatogenesis in the immature rat.** Biol. Reprod. 21, 241-49.
48. Chemes, H.E. et al. 1979.b **Is testosterone involved in the initiation of spermatogenesis in humans? A clinicopathological presentation and physiological considerations in four patients with Leydig cell tumors of the testis or secondary Leydig cell hyperplasia.** Int. J. Androl. 5, 239-45.
49. Cheng, S.L. and Musto, N.A. 1982 **Purification and characterization of androgen-binding protein from the rabbit epididymis.** Biochemistry 21, 2400-05.
50. Cheng, S.L. et al. 1984 **Comparasion of rabbit androgen-binding protein with testosterone estradiol binding globulin I. Physical and chemical properties.** J. Steroid Biochem. 21, 669-76.
51. Cheng, C.Y. et al. 1984 **Human testicular androgen-binding protein shares immunodeterminants with serum testosterone-estradiol-binding globulin.** Endocrinology 114, 1395-1401.
52. Cheng, C.Y. et al. 1985 **There are two forms of androgen-binding protein in the testis. Comparasion of their protomeric variants with serun testosterone-estradiol-binding globulin.** J. Steroid Biochem. 260, 5631-40.
53. Cheng, L. et al. 1994 **Role of leukemia inhibitory factor and its receptor im mouse primordial germ cells growth.** Development 120, 3145-53.
54. Christensen, A.K. 1975 **Leydig cells.** In: **Handbook of Physiology.** Vol, 5. 57-94.
55. Danzo, B.J. et al. 1973 **Characterization of a cytoplasmic receptor for a 5 α -dihidrotestosterone in caput epididymis of intact rabbits.** Endocrinology 92, 310-7.

56. Danzo, B.J. et al. 1974 **Studies on the site of origin of the androgen binding protein present in epididymal cytosol from mature intact rabbits.** Steroids 24, 107-22.
57. Danzo, B.J. et al. 1977 **Androgen-binding protein (ABP) in fluids collected from the rete testis and cauda epididymis of sexually mature and immature rabbits and observations on morphological changes in the epididymis following ligation of the ductuli efferentes.** Biol. Reprod. 17, 64-77.
58. Danzo, B.J. et al. 1980 **Binding of the photoaffinity ligand 17 beta-hydroxy-4, 6-androstadien-3-one to rat androgen-binding protein: comparison with the binding of 17 beta-hydroxy-5alpha-androstan-3-one.** Endocrinology 107, 1169-75.
59. De Felici, M. and Dolci, S. 1991 **Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers.** Dev. Biol. 147, 281-4.
60. De Miguel, M.P. et al. 1996 **Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotropic factor promote the survival of Sertoli cells and gonocytes in coculture system.** Endocrinology 137 1885-93.
61. De Rooij, D.G. and Lok, D. 1987 **Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia.** Anat Rec 217:131-136
62. Dermer, G.B. 1978 **Basal cell proliferation in benign prostatic hyperplasia.** Cancer 41, 1857-62.
63. Di Sant'Agnes, P.A. and de Mesy Jensen, K.L. 1984 **Somatostatin and / or somatostatin-like immunoreactive endocrine-paracrine cells in the human prostate gland.** Arch. Pathol. Lab. Med. 108, 693-6.
64. Di Sant'Agnes, P.A. et al. 1985 **Human prostatic endocrine-paracrine cells: distributional analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity and silver stains.** Arch. Pathol. Lab. Med. 109, 607-12.
65. Di Sant'Agnes, P.A. et al. 1986 **Calcitonin-like immunoreactive and bombesin-like immunoreactive endocrine-paracrine cells of the human prostate.** Arch. Pathol. Lab. Med. 110, 412-15.
66. Dix, D.J. et al. 1996 **Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility.** Proc. Nat. Acad. Sci. 93, 3264-897.

67. Dym, M. and Clemont, Y. 1970 **Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following X-irradiation of the rat testis.** Am. J. Anat. 128, 265-82.
68. Dym, M. and Fawcett, D.W. 1970 **The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium.** Biol. Reprod. 3, 308-26.
69. Dym, M. 1977 **The role of the Sertoli cell in the spermatogenesis.** In: Male reproductive system. pp155-69.
70. Dunkel, L. et al. 1997 **Clinical ramifications of apoptosis in human testes.** In: Cell Death in Reproductive Physiology. Tenniswood Editors, N.Y.
71. Ebling, F.J. et al. 2000 **Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse.** Endocrinology 141, 2861-9.
72. Eddy, E.M. et al. 1996 **Target disruption of the estrogen receptor gene in male causes alterations of spermatogenesis and infertility.** Endocrinology 137, 4796-805.
73. Elftman, H. 1950 **The Sertoli cell cycle in the mouse.** Anat. Rec. 106, 381-93.
74. Elledge, S.J. 1996 **Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis.** Science 274:1664-1671
75. Esteban, C. et al. 1997.a **Sertoli cell-specific expression of rat androgen-binding protein in transgenic mice: effects on somatic cell lineages.** Mol Cell Endocrinol 132, 127-36.
76. Esteban, C. et al. 1997.b **La surexpression de l'Androgen-binding protein (ABP) provoque des modifications morphologiques et fonctionelles dans le testicule de souris.** Andrologie 12, 316-22.
77. Fawcett, D.W. 1958 **The structure of the mammalian spermatozoon.** Int. Rev. Cytol. 7, 195-234.
78. Fawcett, D.W. et al. 1959 **The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation.** J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 453-60.
79. Fawcett, D.W. and Philips, D.M. 1969 **Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis.** J. Reprod. Fertil. 6, 405-18.
80. Fawcett, D.W. and Philips, D.M. 1969 **The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoa.** Anat. Rec. 165, 153-84.

81. Fawcett, D.W. et al. 1971 **Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head.** Dev. Biol. 26, 220-51.
82. Fawcett, D.W. 1975 **Ultrastructure and function of the Sertoli cell.** In: Handbook of Physiology. Vol, 5. 21-55.
83. Fawcett, D.W. 1975 **The mammalian spermatozoon.** Dev. Biol. 44, 394-436.
84. Feldman, L. et al. 1981 **Androgen-binding protein. Purification from rat epididymis, characterization and immunocytochemical localization.** J. Biol. Chem. 256, 5170-5.
85. Fenstermacher, D.A. and Joseph, D.R. 1998 **Analysis of promoter and androgen regulatory sequences required for optimal transcription of the rat androgen-binding protein gene.** J Androl 19, 81-91.
86. Fortunati, N. et al. 1992 **Receptor for sex steroid-binding protein of endometrium membranes: solubilization, partial characterization, and role of estradiol in steroid-binding protein-soluble receptor interaction.** Steroids 57, 464-70.
87. Fortunati, N. et al. 1996 **Sex steroid binding protein exerts a negative control on estradiol action in MCF-7 cells (human breast cancer) through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase A.** Endocrinology 137, 686-692.
88. Fortunati, N. et al. 1999 **Estradiol induction of cAMP in breast cancer cells is mediated by foetal calf serum (FCS) and sex hormone-binding globulin (SHBG).** J Steroid Biochem Mol Biol 70, 73-80.
89. Foucher, J.L. and Le Gac, F. 1989 **Evidence for androgen-binding protein in the testis of teleost fish: A potential marker of Sertoli cell function.** J. Steroid Biochem. 32, 545-52.
90. Foucher, J.L. et al. 1991 ***In vivo* and *in vitro* studies on sex steroid binding protein (SBP) regulation in rainbow trout: Influence of sex steroid hormones and of factors klinked to growth and metabolism.** J. Steroid Biochem. 39, 975-86.
91. French, F.S. and Ritzén, E.M. 1973 **A high affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: Evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis.** Endocrinology 93, 88-95.
92. Fritz, I.B. et al. 1974 **Effects of FSH on levels of androgen-binding protein in the testis.**
93. Fritz, I.B. et al. 1976 **Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures.** J

- Reprod Fertil 46, 17-24. In: Hormone Binding and Cell Target Activation in the Testis. Plenum, N. Y. 311-27.
94. Furuchi, T. et al. 1996 **Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia.** Development 122, 1703-9.
95. Gerard, A. et al. 1988 **Electron microscope radioautographic evidence of in vivo androgen-binding protein internalization in the rat epididymis principal cells.** Endocrinology 122, 1297-307.
96. Gerard, A. et al. 1992 **Endocytosis of human sex steroid-binding protein in monkey germ cells.** Ann N Y Acad Sci 637,258-76.
97. Gerard, H. et al. 1994 **Spermatogenic cells do internalize Sertoli androgen-binding protein: a transmission electron microscopy autoradiographic study in the rat.** Endocrinology 134, 1515-27.
98. Gerard, A. et al. 1996 **Sertoli Androgen-binding protein and fertility in humans. 9th European testis workshop on Molecular and Cellular Endocrinology G4.**
99. Gershagen, S. et al. 1987 **A cDNA coding for human sex hormone-binding globulin. Homology to vitamin K-dependent protein S.** FEBS Lett. 220, 129-35.
100. Gershagen, S. et al. 1989 **Characterization of the human sex hormone-binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis.** Nucleic Acids Res. 17, 2945-58.
101. Gilula, N.B. et al. 1976 **The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis.** Dev. Biol. 50, 142-68.
102. Gregory, C.W. and DePhilip, R.M. 1998 **Detection of steroidogenic acute regulatory protein (stAr) in mitochondria of cultured rat Sertoli cells incubated with follicle-stimulating hormone.** Biol. Reprod. 58, 470-4.
103. Grenot, C. et al 1992 **Characterization of Met-139 as the photolabeled amino acid residue in the steroid binding site of sex hormone binding globulin using delta 6 derivatives of either testosterone or estradiol as unsubstituted photoaffinity labeling reagents.** Biochemistry 31, 7609-21.
104. Griffin, J.E. and Wilson, J.D. 1992 **Disorders of the testis and male reproductive tract.** In: Textbook of Endocrinology. 799-852.
105. Grishkovskaya, I. 2000 **Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain.** EMBO J 19, 504-512.

106. Griswold, M.D. 1993 **Actions of FSH on mammalian Sertoli cells**. In: The Sertoli cell. 493-508.
107. Gunsalus, G.L. et al. 1980 **Bidirectional release of a Sertoli cell product, androgen-binding protein, into the blood and seminiferous tubule. In: Testicular development. Structure and Function**. Raven Press, N. Y 291-97.
108. Gunsalus, G.L. et al. 1984 **Use of androgen-binding protein to monitor development of the seminiferous epithelium**. In: Sexual differentiation. Basic and Clinical Aspects. Raven Press, N.Y. 53-64.
109. Hagenäs, L. et al. 1975 **Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP)**. Mol. Cell Endocrinol. 2, 339-50.
110. Hales, D.B. and Payne, A.H. 1989 **Glucocorticoid-mediated repression of P450scc mRNA and the novo synthesis in cultured Leydig cells**. Endocrinology 124, 2099-104.
111. Hall, S.H. et al. 1988 **Follicle-stimulating hormone induces transient expression of the proto-oncogen c-fos in primary Sertoli cell cultures**. Mol. Endocrinol. 2, 55-61.
112. Hall, S.H. et al 1990 **Follicle-stimulating hormone regulation of androgen-binding protein messenger RNA in Sertoli cell cultures**. Mol Endocrinol 4, 349-55.
113. Hammond, G.L. et al. 1987 **The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid-binding domain**. FEBS Lett 215, 100-04.
114. Hammond, G.L. et al. 1989 **The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs**. Mol Endocrinol 3, 1869-76
115. Hanson, V. 1972 **Further characterization of the 5 α -dihydrotestosterone binding protein in the epididymal cytosol fraction**. Steroids 20, 575-96.
116. Hanson, V. et al. 1973 **FSH stimulation of androgen-binding protein**. Nature New Biol. 246, 56-8.
117. Hanson, V. et al. 1975.a **Testicular androgen-binding protein (ABP) – A parameter of Sertoli cell secretory function**. In: Hormonal Regulation of Spermatogenesis. Plenum, N. Y. 323-35.
118. Hanson, V. et al. 1975.b **Regulation of seminiferous tubular function by FSH and androgen**. J. Reprod. Fertil. 44, 363-75.

119. Hansson, V. et al. 1976 **Secretion and role of androgen-binding proteins in the testis and epididymis.** J. Reprod. Fertil Suppl. 17-33.
120. Hanson, V. et al. 1976 **Hormonal regulation of spermatogenesis.** Vitam. Horm. 34, 187-214.
121. Heckert, LL. and Griswold, M.D. 1991 **Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testis and Sertoli cells.** Mol. Endocrinol. 5, 670-77.
122. Hedrick, L. and Epstein, J. 1989 **Use of keratin 903 as an adjunct in the diagnosis of prostate carcinoma.** Am. J Surg. Pathol. 13, 389-96.
123. Helpap, B. 1995 **Anatomy and physiology of the prostate and pathological anatomy and pathophysiology of the benign prostate hyperplasia (BHP).** Thieme 3.1-3.27.
124. Henriksen, K. et al. 1995 **Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate.** Endocrinology 136:3285-3291
125. Henriksen, K. et al. 1998 **Stage-specific apoptosis of male germ cells in the rat: mechanisms of cell death studied by supravital squash preparations.** Tissue Cell 30, 692-701.
126. Hermo, L. et al. 1998 **Androgen binding protein secretion and endocytosis by principal cells in the adult rat epididymis and during postnatal development.** J. Androl. 19, 527-41.
127. Hettle, J.A. et al. 1988 **Rat testicular peritubular cells in culture secrete an inhibitor of plasminogen activator activity.** Biol. Reprod. 38, 359-71.
128. Hildebrand, C. et al. 1995 **Resolution of the steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin by expression in Escherichia Coli.** Biochemistry 34, 3231-38.
129. Horvath, L.G. et al. 2001 **Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer.** Cancer Res. 61, 5331-5.
130. Houchereu-de Rivers, M.T and Courot, M. 1978 **Sertoli cells and development of seminiferous epithelium.** Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 18, 573-83.
131. Hryb, D.J. et al. 1990 **The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones.** J. Biol. Chem. 265, 6048-54.
132. Huckins, C. 1971 **The spermatogonial stem cell population in the adult rats. Their morphology, proliferation and maturation.** Anat. Rec. 169, 533-58.

133. Huckins, C. 1978 **The morfology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: An analysis using a simplified classification of the germinal epithelium.** Anat. Rec. 190, 905-26.
134. Huckins, C. and Oakberg, E.F. 1978 **Morfological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testis using whole mounted seminiferous tubules.** Anat. Rec. 192, 529-41.
135. Huckins, C. 1978 **Spermatogonial intercellular bridges in whole-mounted seminiferous tubules from normal and irradiated rodent testes.** Am. J. Anat. 153, 97-122.
136. Huhtaniemi, I. and Catt, K.J. 1981 **Induction and maintenance of gonadotropin and lactogen receptors in hypoprolactinemic rats.** Endocrinology 109, 483-90.
137. Huhtaniemi, I. et al. 1982 **Testicular luteinizing hormone receptor content, and in vitro stimulation of cyclicadenosine-3', 5'-monophosphate and steroid production: a comparison between man and rat.** J. Clin. Endocr. Metab. 55, 882-89.
138. Huhtaniemi, I. et al. 1983 **Comparison of serum steroid responses to a single injection of hCG in man and rat.** J. Steroid Biochem. 19, 1147-51.
139. Huhtaniemi, I. 1993 **Hormonal control mecanisms of Leydig cells.** In: **The Molecular Biology of the Male Reproductive System.** Acad. Press 383-410.
140. Ip, Y.C. 2000 **The rabbit sex hormone-binding globulin gene: structural organization and characterization of its 5-flanking region.** Endocrinology 141, 1356-65.
141. Isomaa, V. et al. 1985 **Nuclear androgen receptors in different stages of the seminiferous epithelial cycle and the interstitial tissue of rat testis.** Endocrinology 116, 132-37.
142. Jänne, M. et al. 1998 **Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice.** Mol Endocrinol 12, 123-36.
143. Jänne, M. et al. 1999 **Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development.** Endocrinology 140, 4166-74.
144. Johnson, L. et al. 1986a **Characterization of the testicular abnormality in 5alpha-reductase deficiency.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 63, 1091-99.
145. Johnson, L. et al. 1986b **Age-related variation in seminiferous tubules in men: a estereologic evaluation.** J. Androl., 7, 316-22.

146. Johnson, L. et al. 1988 **Effect of age on the composition of seminiferous tubular boundary tissue and on the volume of each component in humans.** *Fertil. Steril.*, 49, 1045-51.
147. Johnson, L. et al. 1991 a **Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions.** *Biol. Reprod.* 45, 404-10.
148. Johnson, L. et al. 1991 b **Effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in horse.** *J. Reprod. Fertil.* 44, 87-97.
149. Johnson, L. et al. 1994 **The relationship of daily sperm production with the number of Sertoli cells and testicular size adult horses: role of primitive spermatogonia.** *J. Reprod. Fertil.* 100, 315-21.
150. Jones, E.G. and Harper, M.E. 1992 **Studies on the proliferation, secretory activities, and epidermal growth factor receptor expression in benign prostatic hyperplasia explant cultures.** *Prostate* 20, 133-49.
151. Joseph, D.R. et al. 1985 **Identification of complementary DNA clones that encode rat androgen binding protein.** *J Androl* 6, 392-95.
152. Joseph, D.R. et al. 1988 **The gene structure of rat androgen-binding protein: Identification of potential regulatory deoxyribonucleic acid elements of a follicle-stimulating hormone-regulated protein.** *Mol. Endocrinol.* 2, 3-13.
153. Joseph, D.R. et al. 1991.a **Genetic mapping of the gene for androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin to mouse chromosome 11.** *Cytogenet Cell Genet* 56, 122-24.
154. Joseph, D.R. et al. 1991.b **Complex structure and regulation of the ABP/SHBG gene.** *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 771-5.
155. Joseph, D.R. and Baker, M.E. 1992 **Sex hormone-binding globulin, androgen-binding protein, and vitamin K-dependent protein S are homologous to laminin A, merosin, and Drosophila crumbs protein.** *FASEB J* 6, 2477-81.
156. Joseph, D.R. and Lawrence, W. 1993 **Mutagenesis of essential functional residues of rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin.** *Mol. Endocrinol.* 7, 488-96.
157. Joseph, D.R. 1994 **Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin.** *Vitam. Horm.* 49, 197-280.
158. Joseph, D.R. et al. 1997.a **Expression and distribution of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in the female rodent reproductive system.** *Biol Reprod.* 56, 14-20.

159. Joseph, D.R. et al. 1997.b **Overexpression of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in male transgenic mice: tissue distribution and phenotypic disorders.** Biol. Reprod. 56, 21-32.
160. Kato, T. and Horton, R. 1968 **Estudies of testosterone binding globulin.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1160-8.
161. Kerr, J.B. and Kretser, D.M. 1974 **The role of the Sertoli cell in phagocytosis of the residual bodies of the spermatids.** J. Reprod. Fertil. 36, 439-40.
162. Kerr, J.F.R. et al. 1984. **Apoptosi.** In: Potten CS (ed) Perspectives on mammalian cell death. Oxford University Press, pp 93-128.
163. Khan, M.S. et al. 1981 **Secretion of testosterone-estradiol-binding globulin by human hepato-derived cell line.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 53, 448-9.
164. Khan, M.S. et al. 1990 **Delineation and synthesis of the membrane receptor-binding domain of sex hormone-binding globulin.** J. Biol. Chem. 265, 18362-65.
165. Kierszenbaum, A.L. et al. 1980 **Localization of androgen-binding protein in proliferating Sertoli cells in culture.** Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 5322-6.
166. King, K.L. and Cidlowski, J.A. 1995 **Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death.** J Cell Biochem 58:175-180
167. Kodaira, K. et al. 1996 **Overexpression of c-myc induces apoptosis at the prophase of meiosis of rat primary spermatocytes.** Mol Reprod Dev 45:403-410
168. Kormano, M. and Hovatta, O. 1972 **Contractility and histochemistry of the myoid cell layer of the rat seminiferous tubules during postnatal development.** Z. Anat. Entwickl. 137, 239-48.
169. Kotite, N.J. et al. 1986 **Comparasion of rabbit epididymal androgen-binding protein and serum testosterone-estradiol-binding globulin II.** Immunological properties. J. Steroid Biochem. 25, 171-6.
170. Kovaks, W.J. et al. 1988 **Monoclonal antibodies to rat androgen-binding protein recognize both of its subunits and cross-react with the rabbit and human testosterone-binding globulin.** Endocrinology 122, 2639-47.
171. Krajewski, S. et al. 1994.a **Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2.** Am. J Pathol. 145, 1323-36.
172. Krajewski, S. et al. 1994.b **Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-x expression.** Cancer Res. 54, 5501-7.
173. Kretge, J.H. et al. 1998. **Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor-beta.** Proc. Nat. Aca. Sci. 95, 15677-82.

174. Kretser, D.M. et al. 1998 **Spermatogenesis**. Hum. Reprod. 13, 1-8.
175. Kudson, C.M. et al. 1995 **Bax deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death**. Science 270, 96-9.
176. Kumar, T.R. et al. 1997 **Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility**. Nature Genet. 15, 201-04.
177. Lalli, M.F. and Clermont, Y. 1981 **Structural changes of the head components of the rat spermatid during spermatogenesis**. Am. J. Anat. 160, 419-34.
178. Laron, Z. et al. 1971 **Juvenile hypothyroidism with testicular enlargement**. Acta Paediatr. Scand. 59, 317-22.
179. Larriba, S. et al. 1995 **Androgen binding protein is tissue-specifically expressed and biologically active in transgenic mice**. J Steroid Biochem. Mol. Biol. 53, 573-8.
180. Lawson, K.L. et al. 1999 **Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo**. Genes Dev. 13, 424-36.
181. Leblond, C.P. and Clermont, Y. 1952.a **Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfuric acid technique**. Am. J. Anat. 90, 167-215.
182. Leblond, C.P. and Clermont, Y. 1952.b **Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat**. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55, 548-73.
183. Lee, I.R. et al. 1987 **Sex hormone-binding globulin secretion by human hepatocarcinoma cells is increased by both estrogens and androgens**. J Clin. Endocrinol. Metab. 64, 825-31.
184. Lee, J. et al. 1997 **The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis**. Endocrinology 138, 2081-8.
185. Leung, P.C. et al. 1992 **Intracellular signalling in the gonads**. Endocr. Rev. 13, 476-98.
186. Levallet, J. et al. 1998 **Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells**. Biol. Reprod. 58, 919-26.
187. Lindzey, J. et al. 1998 **Effects of castration and chronic steroid treatment on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor-alpha knock-out mice**. Endocrinology 139, 4092-10

188. Loveland, K.L. and Schlatt, S. 1997 **Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis.** *J Endocrinol.* 153, 337-44.
189. Mahato, D. et al. 2000 **Spermatogenic cells do not require estrogen receptor-alpha for development or function.** *Endocrinology* 141, 1273-6.
190. Mak, P. and Callard, G.V. 1987 **A novel steroid-binding protein in the testis of dogfish.** *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 104-12.
191. Manduit, C. et al. 1999 **Stem cell factor / c-kit system in spermatogenesis.** *Hum. Reprod.* 5, 535-45.
192. Manova, K. et al. 1991 **Expression of c-kit encoded at the W locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblast.** *Dev. Biol.* 146, 312-24.
193. Manova, K. et al. 1993 **The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role of c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia.** *Dev. Biol.* 157, 85-99.
194. Mao, P. and Angrist, A. 1966 **The fine structure of the basal cell of the human prostate.** *Lab. Invest.* 15, 1768-82.
195. Mather, J.P. et al. 1983 **The hormonal and cellular control of Sertoli cell secretion.** *J. Steroid Biochem.* 19, 41-51.
196. Matikainen, T. et al. 1994 **Effects of recombinant human FSH in immature hypophysectomized male rats: evidence for Leydig-cell mediated action on spermatogenesis.** *J. Endocrinol.* 141, 449-57.
197. Matsubara, N. et al. 1996 **A receptor tyrosin kinase, Sky, and its ligand Gas 6 are expressed in gonads and support primordial germ cells growth or survival in culture.** *Dev. Biol.* 180, 499-510.
198. Matsumoto, A.M. 1989 **Hormonal control of human spermatogenesis.** In: *The Testis.* Raven Press, N. Y. 181-96.
199. Mays-Hoopers, L.L. et al. 1995 **Preparation of spermatogonia, spermatocytes and round spermatids for analysis of gene expression using fluorescence-activated cell sorting.** *Biol. Reprod.* 53, 1003-1011.
200. McGenly, D.M. et al. 1979 **Gap junctions between Sertoli cells and germ cells of rat seminiferous tubules.** *Tissue and Cell.* 11, 475-98.
201. McNeal, J.E. 1968 **Regional morphology and pathology of the prostate.** *Am J Clin. Pathol.* 49, 347-57.

202. McNeal, J.E. 1969 **Origin and development of carcinoma in the prostate.** *Cancer* 23, 24-34.
203. McNeal, J.E. 1970 **Age-related changes in the prostatic epithelium asociated with carcinoma.** In: Some aspects of aetiology and biochemistry of prostatic cancer. Tecnovus Publications 23-32.
204. McNeal, J.E. 1972 **The prostate and prostatic urethra: A morphologic synthesis.** *J Urol.* 107, 1008-16.
205. McNeal, J.E. 1978 **Origin and evolution of bening prostatic enlargement.** *Invest. Urol.* 15, 340-5.
206. McNeal, J.E. 1984 **Aging and the prostate. In: Urology and the elderly.** Churchill Livingstone 193-202.
207. McNeal, J.E. 1988.a **The prostate gland: morphology, pathology, ultrasound anatomy.** *Monogr. Urol.* 9, 36-54.
208. McNeal, J.E. 1988.b **Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma: correlation with histologic patterns and direction spread.** *Am J Surg. Pathol.* 12, 897-906.
209. McNeal, J.E. 1988.c **Normal histology of the prostate.** *Am. J Surg. Pathol.* 12, 619-33.
210. McNeal, J.E. 1990 **Capsular penetration in prostatic cancer: significance for natural hisotry and treatment.** *Am. J Surg. Pathol.* 14, 240-7
211. Mercier, C. et al. 1966 **Testosterone binding globulin in human plasma.** *Int. Congr. Ser.* 212 (Abstr.).
212. Mercier-Bodard, C. et al. 1991 **Effects of hormones on SBP mRNA levels in human cancer cells.** *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 777-85.
213. Misao, R. et al. 1998.a **Expression of sex hormone-binding globulin exon VII splicing variant messenger ribonucleic acid in human ovarian endometriosis.** *Fertil. Steril.* 69, 324-28.
214. Misao, R. et al. 1998.b **Dominant expression of sex-hormone-binding-globulin exon-7 splicing variant over wild-type mRNA in human ovarian cancers.** *Int. J Cancer* 77, 828-32.
215. Misao, R. et al. 1997.a **Expression of sex hormone-binding globulin exon VII splicing variant mRNA in human uterine endometrium.** *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 385-90.

216. Misao, R. et al. 1997.b **Expression of sex hormone-binding globulin exon VII splicing variant messenger RNA in human uterine endometrial cancers.** *Cancer Res.* 57, 5579-83.
217. Misao, R. et al. 1997.c **Expression of sex hormone-binding globulin mRNA in uterine cervical cancers.** *Tumour Biol.* 18, 6-12.
218. Mita, M. and Hall, P.F. 1982 **Metabolism of round spermatids from rats: Lactate as the preferred substrate.** *Biol. Reprod.* 26, 445-55.
219. Monaco, L. and Conti, M. 1987 **Inhibition by phorbol esters and other tumor promoters of the response of the Sertoli cell to FSH: evidence for dual site of action.** *Mol. Cell Endocrinol.* 49, 227-36.
220. Monesi, V. 1965 **Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. RNA and Protein.** *Exptl. Cell Res.* 39, 197-224.
221. Montironi, R. et al. 1994 **Effect of LHRH agonist and flutamide (combination endocrine therapy) on the frequency and location of proliferating cell nuclear antigen and apoptotic bodies in prostatic hyperplasia.** *J Urol. Pathol.* 2, 161-71.
222. Montminy, M.R. et al. 1990 **Characteristics of the cAMP response unit.** *Metabolism* 39, 6-12.
223. Moore, K.H. et al. 1996 **Sex hormone binding globulin mRNA in human breast cancer: detection in cell lines and tumor samples.** *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59, 297-304.
224. Mori, H. and Christensen, A.K. 1980 **Morphometric analysis of Leydig cells in normal rat testis.** *J. Cell. Biol.* 84: 340-54.
225. Moses, M.J. 1968 **Synaptinomal Complex.** *Ann. Rev. Genet.* 2, 363-412.
226. Munsie, M. et al. 1997 **Expression of stem cell factor in the postnatal rat testis.** *Mol. Reprod. Dev.* 47, 19-25.
227. Murayama, Y. et al. 1999 **The shbg Gene and Hormone Dependence of Breast Cancer: A Novel Mechanism of Hormone Dependence of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Based upon SHBG.** *Breast Cancer* 6, 338-43.
228. Murphy, B.E.P. 1968 **Binding of testosterone and estradiol in the plasma.** *Can. J. Biochem.* 46, 299-302.
229. Musto, N. et al. 1980 **Purification and characterization of androgen binding protein from the rat epididymis.** *Biochemistry* 19, 2853-60.
230. Myers, R.P. et al. 1987 **Prostate shape, external striated urethral sphincter and radical prostatectomy: The apical dissection.** *J Urol.* 138, 543-50.

231. Nakhla, A.M. et al. 1996 **Estimulation of prostate cancer growth by androgens and estrogens through the intermediacy of sex hormone-binding globulin.** *Endocrinology* 137, 4126-9.
232. Nakhla, A.M. et al. 1997 **Estradiol activates the prostate androgen receptor and prostate-specific antigen secretion through the intermediacy of sex hormone-binding globulin.** *J. Biol. Chem.* 272, 6838-41
233. Nakhla, A.M. et al. 1999 **Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceed via a G protein.** *Esteroids* 64, 213-6.
234. Nandi, S. et al. 1999 **Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawl by ethane 1,2-dimethylsulfonate administration: relationship to Fas?** *Biol. Reprod.* 61, 70-5.
235. Nantel, F. et al. 1996 **Spermatogenesis deficiency and ger cell apoptosis in CREM-mutant mice.** *Nature* 380, 159-62.
236. Nilsen, J. et al. 2000 **Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system.** *J Neurobiol.* 43, 64-78.
237. Oakberg, E.F. 1956 **A description of spermatogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal.** *Am. J. Anat.* 99, 391-413.
238. Odorisio, T. et al. 1988 **The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis.** *Nat. Genet.* 257-61.
239. Oke, B.O. and Suárez-Quian, C.A. 1993 **Localization of secretory, membrane-associated and cytoskeletal proteins in rat testis using an improved immunocytochemical protocol that employs polyester wax.** *Biol. Reprod.* 48, 621-31.
240. Ogawa, S et al.1998. **Molecular cloning and caracteritzation of human estrogen receptor β cx i a potential inhibitor of estrogen action in humans.** *Nucleic Acids Res.* 26, 3505-12.
241. Olaso, R. et al. 1998 **Transforming growth factor β 1 and β 2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis.** *Endocrinology* 139, 733-40.
242. Oltvai, Z.N. et al. 1993 **Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates prograded cell death.** *Cell* 74, 609-19.

243. Orth, J.M. and Christensen, A.K. 1978 **Autoradiographical localization of specifically bound ¹²⁵I-labeled follicle-stimulating hormone on spermatogonia of the rat testis.** *Endocrinology* 103, 1944-51.
244. Orth, J.M. 1982 **Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study.** *Anat. Rec.* 203, 485-92.
245. Orth, J.M. 1984 **Role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in the testis of fetal rats.** *Endocrinology* 115, 1248-55.
246. Orth, J.M. et al. 1988 **Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development.** *Endocrinology* 122, 787-94.
247. Packer, A.I. et al. 1995 **Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes.** *Mol. Reprod. Dev.* 42, 303-10.
248. Parvinen, M. et al. 1986 **Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle.** *Int. Rev. Cytol.* 104, 115-51.
249. Pasquali, D. et al. 2001 **Estrogen receptor expression in human prostate tissue.** *Mol. Cell Endocrinol.* 178, 47-50
250. Pearlman, W.H. and Crepy, O. 1967 **Steroid-protein interaction with particular reference to testosterone binding by human serum.** *J. Biol. Chem.* 242, 182-89.
251. Pearlman, W.H. et al. 1967 **Testosterone-binding levels in the serum of women during the normal menstrual cycle, pregnancy and the post-partum period.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 1012-8.
252. Pelletier, G. et al. 2000 **Localitzation of oestrogen receptor-alpha, oestrogen receptor-beta and androgen receptor in the rat reproductive organs.** *J. Endocrinol.* 165, 359-70.
253. Pelliniemi, L.J. et al. 1981 **Immunocytochemical localization of androgen-binding protein in the male rat reproductive tract.** *Endocrinology* 108, 925-31.
254. Pentakainen, V. et al. 2000 **Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro.** *J. Clin. Endocrinol. Met.* 85, 2057-67.
255. Petra, P.H. et al. 1986 **Comparation of the amino acid sequence of sex steroid-binding globulin of human plasma (SBP) with that of the androgen-binding protein (ABP) in rat testis.** *Colloq-Inst. Natl. Sante Rech. Med.* 149, 137-42.
256. Philips, D.M. et al. 1989 **Corticosteroid 11b-dehydrogenase in rat testis.** *Endocrinology* 125, 209-16.

257. Plymate, S.R. et al. 1988 **Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin.** J Clin. Endocrinol. Metab. 67, 460-4.
258. Plymate, S.R. et al. 1991 **Effects of sex hormone binding globulin (SHBG) on human prostatic carcinoma.** J Steroid Biochem. Mol. Biol. 40, 833-9.
259. Porto, C.S. et al. 1992 **Binding of sex-hormone-binding globulin (SHBG) to testicular membranes and solubilized receptors.** Mol Cell Endocrinol 89, 33-8.
260. Que, B.G. and Petra, P.H. 1987 **Characterization of cDNA coding for sex steroid-binding protein of human plasma.** FEBS Lett. 219, 405-09.
261. Reese, J.H. et al. 1986 **Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and the seminal vesicle.** J Urol. 136, 1148-52.
262. Reese, J.H. et al. 1988 **Tissue type plasminogen activator as a marker for functional zones within the human prostate gland.** Prostate 12, 47-53.
263. Reese, J.H. et al. 1992 **Distribution of lactoferrin in the normal and inflamed human prostate: an immunohistochemical study.** Prostate 20, 73-85.
264. Reventós, J. et al. 1986 **Testosterone and FSH induction of rat androgen-binding protein in Sertoli cells as studied by complementary DNA.** In: Binding proteins of steroid hormones, vol 149 France: Colloque Inserm/John Libbey Eurotext Ltd. 143-51.
265. Reventós, J. et al. 1988 **Hormonal regulation of rat androgen-binding protein (ABP) messenger ribonucleic acid and homology of human testosterone-estradiol-binding globulin and ABP complementary deoxyribonucleic acids.** Mol . Endocrinol. 2, 125-32.
266. Reventós, J. et al. 1993 **Tissue-specific expression of the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene in transgenic mice.** Mol Cell Endocrinol 96, 69-73.
267. Reventós, J. and Munell, F. 1997 **Transgenic animal models in reproductive endocrine research.** Eur J Endocrinol 136:566-580.
268. Ritzén, E.M. et al. 1971 **Demonstration of androgen-binding components in the rat epididymis cytosol and comparsion with binding components in prostate and other tissues.** Endocrinology 89, 143-51.
269. Ritzén, E.M. et al. 1973 **Characterization of androgen-binding protein (ABP) in rat testis and epididymis.** Steroids 21, 593-607.

270. Ritzén, E.M. et al. 1982 **Stage-dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules.** Mol. Cell Endocrinol. 25, 25-33.
271. Rodriguez, I. et al. 1997 **An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development espermatogenesis.** Embo J 16, 2262-70.
272. Roosen-Runge, E.C. 1973 **Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogeneses.** J. Reprod. Fertil. 35, 339-48.
273. Rosner, W. et al. 1966 **Electrophoretic evidence for the presence of an androgen-binding β -globulin in human plasma.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 59, 806-08.
274. Rosner, W. and Deakins, S.M. 1968 **Testosterone-binding globulins in human plasma: studies on sex distribution and specificity.** J. Clin. Invest. 47, 2109-16.
275. Rosner, W. et al. 1999 **Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane.** J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69, 481-5.
276. Rubin, L.L. et al. 1993 **The cell cycle and cell death.** Current Biol 3:391-394
277. Russell, L.D. and Clermont, Y. 1976 **Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules.** Anat. Rec. 185, 259-78.
278. Russell, L.D. 1977 a **Desmosome-like junctions between Sertoli cells and germ cells in the rat testis.** Am. J. Anat. 148, 301-12.
279. Russell, L.D. 1977.b **Observations on rat Sertoli ectoplasmic specializations in their association with germ cells of the rat testis.** Tissue and Cell. 9, 475-98.
280. Russell, L.D. 1977.c **Movement of spermatocytes from the basal to adluminal compartments of the rat testis.** Am. J. Anat. 148, 313-28.
281. Russell, L.D. and Clermont, Y. 1977 **Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone-treated hypophysectomized rats.** Anat. Rec. 187, 347-66.
282. Russell, L.D. 1978 **The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: A lanthanum tracer study.** Anat. Rec. 190, 99-112.
283. Russell, L.D. and Frank, B. 1978 **Characterization of rat spermatocysts after plastic embedding.** Arch. Androl. 1, 5-18.
284. Russell, L.D. 1979 **Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes and devices for elimination of cytoplasm from the head region of the late spermatids of the rat.** Anat. Rec. 194, 233-46.

285. Russell, L.D. 1979 **Further observations on tubulobulbar complexes formed by late spermatids and Sertoli cells in the rat testis.** Anat. Rec. 194, 213-32.
286. Russell, L.D. and Malone, J.P. 1980 **A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals.** Tissue and Cell. 12, 263-85.
287. Russell, L.D. 1980 **Sertoli-germ cells interaction: A review.** Gamete Res. 3, 179-202.
288. Russell, L.D. et al. 1983 **Development of the acrosome and alignment, elongation and entrenchment of spermatids in procarbazine-treated rats.** Tissue & Cell. 15, 615-26.
289. Russell, L.D. 1984 **Spermiation – the sperm release process: Ultrastructural observations and unresolved problems.** Elec. Micros. Biol. and Med. Chapter 5, 46-65.
290. Russell, L.D. and Peterson, R.N. 1985 **Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates.** Int. Rev. Cytol. 94, 177-211.
291. Russell, L.D. et al. 1986 **Reconstruction of the type-B configuration monkey Sertoli cell (blood-testis) barrier.** Am. J. Anat. 182, 130-47.
292. Russell, L.D. et al. 1987 **Hormonal control of pubertal spermatogenesis.** Endocrinology 120, 1615-32.
293. Russell, L.D. et al. 1988 **The consequences of actin disruption at Sertoli ectoplasmic specialization sites facing spermatids after *in vivo* exposure of rat testis to cytochalasin D.** Biol. Reprod. 39, 105-18.
294. Russell, L.D. et al. 1989 **Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of the Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow.** 184, 179-89.
295. Russell, L.D. et al. 1990 **Histological and Histopathological Evaluation of the Testes.** Cache River Press.
296. Sassone-Corsi, P. 1997 **Transcriptional checkpoints determining the fate of male germ cells.** Cell 88:163-166
297. Saunders, P.T. et al. 1998 **Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells in the rat testis.** J Endocrinol. 156, 13-7.
298. Schmid, K.W. et al. 1994 **Secretogranin II in normal hyperplastic and neoplastic prostate.** Hystopathology 24, 233-9.

299. Setchell, B.P. and Waites, G.H.M. 1975 **The blood testis barrier. In: handbook of physiology.** Am. Phys. Soc. Vol.5, 143-72.
300. Setchell, B.P. 1978 **The mammalian testis.** Paul Elik, Lond.
301. Sharpe, R.M. 1987 **Testosterone and spermatogenesis.** J. Endocrinol. 113, 1-2.
302. Sharpe, R.M. et al. 1988 **Re-evaluation of the intratesticular level of testosterone required for quantitative maintenance of spermatogenesis in the rat.** J Endocrinol 117:19-26
303. Sharpe, R.M. 1994 **Regulation of spermatogenesis. In: The Physiology of Reproduction.** Raven Press, N. Y. 1363-434.
304. Sherwood, S.W. and Schimke, R.T. 1995 **Cell cycle analysis of apoptosis using flow cytometry.** In: Schwartz LM, Osborne BA (eds) *Methods in cell biology.* Academic Press Inc, San Diego, vol 46:77-97
305. Skinner, M.K. and Fritz, I.B. 1985 **Structural characterization of proteoglycans produced by testicular peritubular cells and Sertoli cells.** J Biol. Chem. 260, 11874-83.
306. Skinner, M.K. and Fritz, I.B. 1986 **Identification of non-mitogenic paracrin factor involved in mesenchymal-epithelial cell interactions between testicular peritubular cells and Sertoli cells.** Mol. Cell Endocrinol. 44. 85-97.
307. Solari, A.J. 1964 **The morphology and ultrastructure of the sex vesicle on the mouse.** Exptl. Cell Res. 36, 160-8.
308. Solari, A.J. and Tres, L. 1967 **The ultrastructure of the human sex vesicle.** Chromosoma. 22, 16-31.
309. Southern, E.M. 1975 **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** J Molec Biol 98:503-517
310. Sprando, R.L. and Russell, L.D. 1987 **Comparative study of cytoplasmic elimination in spermatids of selected mammalian species.** Am. J. Anat. 178, 72-80.
311. Steinberger, A. et al. 1975 **Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells.** Endocr. Res. Commun. 2, 261-72.
312. Steinberger, E. 1971 **Hormonal control of mammalian spermatogenesis.** Physiol. Rev. 51, 1-22.
313. Stenoo, O. et al. 1968 **Testosterone binding in human plasma.** Ann. Endocrinol. 29, 141-48.

314. Stephan, H. et al. 1996 **Distribution of deoxyribonuclease I (DNase I) and p53 in rat testis and their correlation with apoptosis.** *Histochem Cell Biol* 106:383-393
315. Stewart, C.L. et al. 1992 **Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor.** *Nature* 359, 76-9.
316. Stupnicki, R. and Bartke, A. 1976 **Binding testosterone in mouse plasma.** *Endocrinology* 68, 150-4.
317. Suárez-Quian, C.A. et al. 1999 **Androgen receptor distribution in adult human testis.** *J Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 350-8.
318. Sullivan, P.M. et al. 1991 **Alternative processing of androgen-binding protein RNA transcripts in fetal rat liver.** Identification of a transcript formed by trans splicing. *J Biol Chem* 266, 143-54.
319. Sullivan, P.M. et al. 1993 **Identification of an alternate promoter in the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene that regulates synthesis of a messenger RNA encoding a protein with altered function.** *Mol. Endocrinol.* 7, 702-15.
320. Tapanainen, J.S. et al. 1993 **Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors.** *Mol. Endocrinol.* 7, 643-50.
321. Tapanainen, J.S. et al. 1997 **Men homozygous for an inactivating mutation of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility.** *Nature Genet.* 15, 205-06.
322. Tash, J.S. et al. 1981 **Regulation of protein kinase inhibitor by follicle-stimulating hormone in Sertoli cells in vitro.** *Endocrinology* 108, 427-34.
323. Taylor, C.A. et al. 1980 **Photoaffinity labeling of rat androgen-binding protein.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77, 234-8.
324. Tcholakian, R.K. and Steinberger, A. 1978 **Progesterone metabolism by cultured Sertoli cells.** *Endocrinology* 103, 1335-43.
325. Tilly, J.L. 1996 **Apoptosis and ovarian function.** *Rev. Reprod.* 1, 162-72.
326. Tindall, D.J. et al. 1974 **Further studies on the accumulation and binding of androgen in rat epididymis.** *Endocrinology* 95, 1119-28.
327. Tindall, D.J. et al. 1974 **The production of androgen-binding protein by Sertoli cells. In: Hormone Binding and Cell Target Activation in the Testis.** Plenum, N. Y. 167-75.

328. Toppari, J. et al. 1991 **Statge and cell specific gene expression and hormone regulation of the seminiferous epithelium.** J. Electron. Microsc. Tech. 19, 203-14.
329. Troiano, L. et al. 1994 **Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat.** Biochem Biophys Res Com 202:1315-1321
330. Van Dissel-Emiliani, F.M. et al. 1996 **Effect of fibroblast growth factor-2 on Sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period.** Endocrinology 137, 647-54.
331. Van Patten, S.M. et al. 1991 **Molecular cloning of the rat testis form of the inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase.** Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 5383-87.
332. Vilar, O. et al. 1962 **The Sertoli cell as a “bridge cell” between the basal membrane and the germinal cells.** Exp. Cell Res. 27, 158-61.
333. Vitale, R. et al. 1973 **The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment.** Anat. Rec. 176, 333-44.
334. Virkkunen, P. et al. 1994 **Structural comparison of human and rat prostate specific acid phosphatase genes and their promoters. Identification of putative androgen response element.** Biochem. Biophys. Res. Commun 202, 49-57.
335. Vermuelen, A. and Verdonck, L. 1968 **Studies on the binding of testosterone to human plasma.** Steroids 11, 609-35.
336. Vernon, R.G. et al. 1972 **Testosterone binding by rat testicular seminiferous tubules.** Excerta Med. 256, 200 (Abstr.).
337. Vernon, R.G. et al. 1974 **Observations on the binding of androgens by rat testis seminiferous tubules and testis extracts.** Mol. Cell Endocrinol. 1, 167-87.
338. Vornberger, W. et al. 1994 **Androgen receptor distribution in rat testis: new implication for androgen regulation of spermatogenesis.** Endocrinology 134, 2307-16.
339. Wang, Y.M. et al. 1989 **The androgen-binding protein gene expressed in CD1 mouse testis.** Mol Cell Endocrinol. 63, 85-92.
340. Wang, Y.M. et al. 1990 **The androgen-binding protein gene is expressed in male and female rat brain.** Endocrinology 127, 3124-30.
341. Wang, R.A. et al. 1998 **Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period.** Biol. Reprod. 58, 1250-6.

342. Watanabe, M. et al. 1997 **Gene transfection of mouse primordial germ cells in vitro and analysis of their survival and growth control.** *Exp. Cell Res.* 230, 76-83.
343. Weaber, G. et al. 1991 **Developmental stage specific expression of cyclic adenosin 3'-5'monophosphate response element binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing.** *Mol. Endocrinol.* 5, 1418-30.
344. Weber, J.E. and Russell, L.D. 1987 **A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat.** *Am. J. Anat.* 180, 1-24.
345. Weddington, S.C. et al. 1976 **Biphasic effect of testosterone propionate on Sertoli cell secretory function.** *Mol. Cell Endocrinol.* 5, 137-45.
346. Weil, M. et al. 1998 **Are caspases involved in the death of cells with transcriptionally inactive nucleus?** *J Cell Sci.* 111, 2707-15.
347. Weinbauer, G.F. and Nieschlag, E. 1990 **The role of testosterone in spermatogenesis.** In: *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution.* 23-50.
348. Weiss, M. et al. 1997 **Pre- and postmeiotic expression of male germ cell specific genes throughout 2 week co-cultures of germinal and Sertoli cells.** *Biol. Reprod.* 57, 68-76.
349. Wenn, R.V. et al. 1977 **Distribution of testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) in the higher vertebrates.** *Endocrinology* 69, 151-6.
350. Wernert, N. et al. 1988 **Investigations of the estrogen (ER-ICA test) and the progesterone receptor in the prostate and prostatic carcinoma on immunohistochemical basis.** *Virchows Arch A* 412, 387-91.
351. Westphal, U. 1986 **Steroid-protein interactions II.** *Monographs on Endocrinology.* Springer-Verlag, Berlin 198-301.
352. Wolosewick, J. and Bryan, J.H.D. 1977 **Ultrastructural characterization of the manchette microtubules in the seminiferous epithelium of the mouse.** *Am. J. Anat.* 150, 301-32.
353. Woolveridge, I. et al. 1998 **Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short- and long-term anti-androgen treatment.** *Mol. Hum. Reprod.* 4, 701-7.
354. Woolveridge, I. et al. 1999 **Apoptosis in rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes.** *Biol. Reprod.* 60, 461-70.

-
355. World Health Organization 1990 **Contraceptive efficacy of testosterone induced azoospermia in normal men.** *Lancet* 336, 955-59.
356. Wyllie A.H. et al. 1980 **Cell death: the significance of apoptosis.** *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306.
357. Yan, W. et al. 2000 **Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro.** *J Cell Sci.* 113, 161-8.
358. Yoshinaga, K. et al. 1991 **Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function.** *Development* 113, 689-99.
359. Zhao, C.Q. and Hogan, B.L. 1996 **Evidence that mouse Bmp8a (Op2) and Bmp8b duplicated genes that play a role in spermatogenesis and placental development.** *Mech. Dev.* 57, 159-68.
360. Zhao, C.Q. et al. 1996 **The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse.** *Genes Dev.* 10, 1657-69.
361. Zhao, C.Q. and Hogan, B.L. 1998 **Bone morphogenetic protein 8A plays a role in the maintenance of spermatogenesis and the integrity of the epididymis.** *Development* 125, 1103-12.