

Derleme

Erkek üreme sistemi ve otofaji

Male reproductive system and autophagy

Nazlı Karagöz CAN* 

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Muğla/TÜRKİYE

Öz

Programlı hücre ölüm mekanizmalarını iyi anlamak, bu mekanizmalardaki herhangi bir bozukluk sonucu oluşabilecek hastalıklara karşı geliştirilecek ilaçlar ve tedavi yaklaşımlarını belirlemede oldukça önemlidir. Son dönemlere ilgi çekici bir programlı ölüm mekanizması olan otofaji bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve bu mekanizmanın aydınlatılması gerekliliği vurgulanmıştır. Erkek üreme sistemi birçok moleküler mekanizmayı barındıran komplike bir sistemdir ve son dönemde, spermatogenik kök hücreler, spermatogonium, spermatozoid ve spermatozoa dahil olmak üzere, spermatogenik hücreler üzerindeki otofajinin etkilerini ve altta yatan mekanizmalarını fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında göstermeyi hedefleyen çalışmalarda literatüre eklenmektedir. Bizde bu çalışma ile erkek üreme sistemi ve otofaji mekanizması arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

Anahtar kelimeler: erkek üreme sistemi; otofaji; programlı hücre ölümü

ABSTRACT

To understand perfectly of programmed cell death mechanisms is quite important in determining the drugs and treatment approaches to be developed against diseases that may occur as a result of any disorder in these mechanisms. Recently, autophagy which is an interesting programmed death mechanism, has attracted the attention of scientists and was emphasized the need to clarify this mechanism. The male reproductive system is a complex system which keeps many molecular mechanisms and recently, it has been added to the literature that aims to demonstrate the effects and the underlying mechanisms of autophagy on spermatogenic cells, including spermatogenic stem cells, spermatogonium, spermatocytes and spermatozoa under physiological and pathophysiological conditions. In this study, we aimed to research the relationship between male reproductive system and autophagy mechanism.

Keywords: autophagy; programmed cell dead; male reproductive system



Giriş

Erkek üreme sistemi testisler, ejakulatin testislerden penise taşınmasını sağlayan duktus sistemi ve aksesuar bezlerden oluşan komplike bir sistemdir. Testislerin ana görevi erkek germ hücresi olan spermin üretimi ve testosteron gibi androjenlerin salınımı iken aksesuar bezlerde ejakulatin sperm dışı elemanlarının oluşumunu sağlamaktadır. Kaliteli bir spermatozoanın oluşumundaki ana prensip, düzgün olarak gerçekleşen bir spermatogenezisdir. Bu sistemde meydana gelebilecek bir bozulma sonucu anormal spermatogenez, spermatogenik hücrelerin korunmasında görev alan programlı hücre ölüm mekanizmalarında bozulmaya, sertoli hücreleri ile olan endoplazmik bağlantılarında kopukluklara neden olarak, oligospermi, azospermi, astenospermi, kriptorşizim gibi ileri erkek infertilitesine neden olmaktadır.[1,2] Son dönemde, spermatogenik kök hücreler, spermatogonium, spermatosit ve spermatozoa dahil olmak üzere, spermatogenik hücreler üzerine programlı hücre ölüm mekanizmalarından biri olan otofajinin etkilerini ve altta yatan mekanizmalarını fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında göstermeyi hedefleyen çalışmalarda literatüre eklenmektedir.[3]

Otofaji, kelime anlamı olarak; yunanca kendi kendini (auto), yeme (phagy) anlamına gelen kelimelerin bir araya gelmesi sonucutüremişbirkelimedir.Uzunömürlüproteinlerinvehasarlı organellerin geri dönüşümünün yüksek oranda korunduğu hücrel bir mekanizmadır.[4] Otofaji; aynı zamanda hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, ihtiyaç duyduğu besin öğelerini kazanabilmek için sitoplazmada bulunan bazı proteinlerin, hücreye ait organellerin ve diğer hücre içerisinde bulunan yapıların lizozomal kompartıman içinde yıkıma uğratıldığı hücrel bir yolağı da ifade etmektedir. [5] Otofajininspermatogenez üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmalarda, otofaji aktivasyonunun, spermatogenik kök hücrelerin devamlılığında ve spermatogenezin korunmasında düzenleyici bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, asıl olarak spermatogenezis ve spermiyogenezis süreçleri sonunda sperm üretiminin gerçekleştiği ve testosteron gibi androjenlerin sentez ve salgılanmasından sorumlu olan testisler ile dışarıya spermin taşınmasından sorumlu olan genital boşaltım kanallarından oluşmaktadır.

Erkek üreme sisteminin bir parçası olan bu genital boşaltım kanalları, duktuseferentes, tuktusepididimis, duktuseferentes, duktusejakulatoryus ve erkek üretrasının

bir parçasıdır. Bunların dışında semenin sperm dışındaki kısmını oluşturan ve spermin beslenmesi için besin kaynağı sağlayan, vezikülaseminalis, aksesuar cinsiyet bezleri, prostad, bulboüretal bezler ve peniste erkek üreme sistemini oluşturan elemanlar arasındadır.[6,7]

Normal bir süreç olarak spermatogenez üç farklı aşamada ilerler; farklanmamış spermatogoniumların hızlı proliferasyona uğradığı mitotik faz; spermatositlerin haploid spermatidleri oluşturduğu mayotik faz ve spermatitlerin karmaşık bir farklılaşma sürecine girdiği sonuç olarak olgun spermatozoanın oluştuğu spermiogenez fazı.[8] Spermatogenez sürekli olarak çok sayıda gametin üretimini içeren komplike bir mekanizmadır. İlk olarak, bir canlının üreme ömrü boyunca spermatogenik kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin devamlılığı gerekmektedir. İkinci olarakta, terminal diferansiye spermatozoanın sürekliliğini sağlayabilmek için yüksek düzeyde fonksiyonel organizasyon ve hassas kontrol gereklidir. Ayrıca, spermatogenezin düzgün olarak gerçekleşebilmesi, uzamış formdaki spermatileri tutan sertoli hücrelerinin ektoplazmik bağlantılarına, sertoli-sertoli hücre bağlantılarının oluşturduğu kan-testis bariyerinin (KTB) yapısal bütünlüğüne de bağlıdır.[8,9] KTB seminifer tübülleri bazal ve luminal olmak üzere iki kompartmana ayırmaktadır. Bazal kompartman içerisinde, spermatogoniumlar ve genç spermatositleri (leptoten, zigoten) barındırırken luminal kompartman ise olgun spermatositler (pakiten), spermatidler ve spermatozoaları barındırır.[10] Spermatidler sertoli hücrelerinin lümenine bakan kısımlarına yerleştikten sonra, haploid hücreler olan spermatozoaya farklılıklar ve epididime doğru ilerlemek üzere seminifer tübül lümenine geçerler. Yapılmış birçok çalışma endoplazmik bağlantıların yapısal bütünlüğünün, yeterli sayıda ve kaliteli spermatozoa oluşumu için gerekli düzenleyici bir faktör olduğunu göstermektedir.[11]

Otofaji Mekanizması

Otofaji, çoklu proteinler tarafından kontrol edilen ve çok ilgi çekici bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Otofagozomun oluşumunun düzenlenmesi ile ilgili olarak en az 30 adet Atg proteini, 3PI3K, m-TOR, AMPK (AMP-aktif protein kinaz), Beclin-1, gibi otofaji aktivasyonunda görev alan proteinler bulunmaktadır.[12] Hasarlanmış ya da işlevselliği bozulmuş proteinlerin ortadan kaldırılması otofaji yolu ile gerçekleşmektedir. Çevresel birçok etken de hücrelerde otofaji mekanizmasını tetiklemektedir.[13] Hücre içerisinde sitoplazmik bileşenlerin süregelen döngüsünü sağlayarak işlev gören otofajiyi etkileyen çevresel etkenler, açlık, hipoksi

ve strestir. Bu çevresel faktörlere karşı hücre homeostazını koruyan ve hücrelerin stres karşısında sağ kalımını sağlayan otofaji, bu gibi stres durumlarının yanısıra, meydana gelebilecek birçok patolojik oluşumda ve yaşın ilerlemesine bağlı meydana gelebilecek durumlarda önemli bir biyolojik olay olarak ortaya çıkmaktadır.[14,15]

Otofaji iyi tanımlanmış üç ayrı mekanizma ile gerçekleşmektedir;

1- Makrotofaji; basit otofajiolarakta adlandırılan bu otofaji mekanizmasında, sitoplazmanın bir kısmını ya da bir organelin tamamının endoplazmikretikulumdan oluşan ve 2 ya da daha çok tabakalı intraselüler bir zar tarafından sarılarak otofagozomun oluşturulduğu nonspesifik bir süreçtir.

2- Mikrotofaji; normal fizyolojik koşullar altında küçük sitoplazmik çözünebilir proteinlerin membraninvajinasyonu ile lizozom içine taşınarak yıkıma uğratıldığı süreçtir.

3- Şaperon aracılı otofaji; HSC 73 adı verilen 73 kDa ısı-şok şaperon proteini gibi spesifik sitosolik şaperonların yardımına ihtiyaç duyan otofajidir. Besin yokluğu, açlık durumunda aktive olur, bu süreçte hem yıkılan proteinler üzerinde hedefleme sinyallerinin olması hem de lizozom membranının üzerinde de spesifik bir reseptörün bulunması gerekmektedir.[6]

Makrotofaji bir diğer genel adı ile otofaji; Atg gen ailesinin kodladığı proteinler ile gerçekleşmektedir. Mayalar üzerine yapılan bir dizi çalışma sonucunda bulunan ve 30'dan fazla tanımlanmış türü vardır.[16] Atg proteinlerinin birçoğu ve bir araya gelerek oluşturdukları protein kompleksleri izolasyon membranları (otofajik kesecik) ve otofagozomların oluşumundan sorumludurlar. Hücrede otofagozomlar "otofaji oluşum merkezi" adı verilen ve memelilerde endoplazmikretikulum ile golgi aygıtı arasında dağınık olarak bulunan otofaji oluşum merkezlerinde ortaya çıkarlar.[17]

Kökeninin; endoplazmikretikulum, mitokondri dışı membranı ve plazma membranı olabileceği varsayılan izolasyon membranının, otofagozom oluşumu ve otofajik yükün lizozomal iletimi için gerekli olan fiziksel ve fonksiyonel etkileşimi;

I- Tetiklenme (indüksiyon) fazı

II- Vezikül nükleasyon (çekirdeklenme) fazı

III- Vezikül uzama fazı

IV- Lizozomla birleşme ve yıkım fazı olmak üzere 4 fazda özetlenebilmektedir.[17]

Erkek Üreme Sistemi ve Otofaji Mekanizması

Otofaji hücre içi makromoleküllerin ve organellerin hücre içine çekildikten sonra lizozomlarla birleşerek otofagozom olarak adlandırılan çift zar kesecikleri ile karakterize edilen

katabolik bir işlemdir.[5] Spermatogenez, büyük oranda enerjiye yani besine ihtiyaç duyulan bir süreç olması sebebi ile açlık, kimyasal kirlilik ve radyasyonun neden olduğu patofizyolojik uyarılara oldukça açık bir mekanizmadır. Bu patofizyolojik koşullar varlığında, otofajik ve apoptotik moleküler mekanizmalar arasında çapraz etkileşim olduğu yapılan daha önceki çalışmalarla bildirilmiştir.[18,19] Hücre içerisinde olması istenmeyen ya da gereksiz olan organeller otofaji mekanizması ile sindirilir ve bu sindirim sonucu ortaya çıkan hücrenin yapı taşları tekrar hücre homeostazını korumak için kullanılmaktadır. Otofaji açlık hücre yaşlanması ve hücre ölümünde temel bir rol oynamaktadır. Otofaji, evrimsel süreçte mayalardan insanlara kadar olan ökaryot canlılarda korunmuş katabolik bir mekanizmadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda aslında mayalar için geliştirilen genetik tarama testlerinin bulunması ile memeli hücre genomunda 'otofaji ile ilgili genler' (ATG) ortaya çıkmıştır.[6]

Otofajinin spermatogenez üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmalarda, otofaji aktivasyonunun, spermatogenik kök hücrelerin devamlılığında ve spermatogenezin korunmasında düzenleyici bir rol oynadığı gösterilmiştir. Aparicio ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış olduğu bir çalışmada ilk kez sağlıklı insan sperminde otofajinin düzenlenmesinde görev alan otofaji protein serilerinin varlığı gösterilmiştir. Atg 5, Atg 16, p62 ve LC3 otofagozomun oluşumunda rol oynarken, m-TOR, Beclin 1 ve AMPK, otofajinin ana düzenleyicileri olarak tanımlanmaktadır. LC-3 otofaji de görev alan proteinler arasında bu yolun düzenlenmesinde en önemli proteinler arasında bulunmaktadır ve otofajinin akışını izlemek için en çok LC3-II / LC3-I oranı kullanılmaktadır. LC3-I sitoplazmada lokalizedir ve otofaji aktivasyonundan sonra, otofagozom içeriğinin tamamı ile daha da bozularak otofagozomal membranlara işlenen LC3-fosfatidiletanolamin konjüğü (LC3-II) oluşturmak üzere fosfatidiletanolamine konjüge edilir. Bu çalışma, LC3-I'in LC3-II 'ye dönüşümünün insan spermatozoasında da gerçekleştiğini ve LC3-II 'nin daha sonra bozulduğunu göstermiştir. Liu ML ve ark. (2015) üreme sistemi üzerine toksik olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiş bir organofosfat olan tri-orto-kresil fosfatı (TOCP) spermatogenik kök hücre kültür ortamına eklemişler ve LC3-II, LC3-II / LC3-I, ATG5 ve Beclin-1 otofajik belirteçlerinin aktivasyonunu incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda sıçan spermatogenik kök hücrelerinde bu belirteçlerin tümünde artış olduğunu bildirmişlerdir. TEM incelemesinde mitokondri ve endoplazmikretikulumda bozulmalar gözlemlendiği ve sitoplazmada içerisinde yoğun



miktarda otofajikvesiküllerin olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli konsantrasyonlarda TOCP eklenerek yapılan bu çalışmada otofajideki artış ve hücre canlılığında azalmaya karşın apoptotik hücrelerin sayısında önemli bir farklılık olmadığı gösterilmiştir.[20] Yine Xu ve ark. (2016) üreme sistemi üzerine toksik etkisi bilinen farklı bir organofosfat (saligeninsiklik-o-tolil fosfat) ile spermatogenik kök hücreler üzerine bir çalışma yapmışlar ve bu organofosfatında otofajik aktivasyonunu belirgin şekilde indüklediğini görmüşlerdir. Ayrıca, TEM ile yapmış oldukları ultrastrüktürel incelemede sitoplazma içerisinde otofajikvakuollerin olduğunu doğrulamışlardır. Bu çalışmada kontrol grubuna ait hücreler ile organofosfat eklenen gruptaki hücreler arasındaki apoptoz oranı benzerlik göstermiştir.[21]

Erkek germ hücrelerinin gelişimi ve hayatta kalması seminifer tübülün antioksidan kapasitesine bağlıdır. Glutasyon (GSH) spermatogenik epitelyumun antioksidan savunmasında önemli bir rol oynar. Spermatogenik hücrelerde GSH eksikliğinin otofajik üzerine olası etkilerini inceleyen bir çalışmada, LC3-II ifadesinde ve otofajik veziküllerin birikiminde anlamlı bir artış gözlenirken, AMPK ya da ATP içeriğinin fosforilasyon seviyesinde bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen kolektif bulgular, spermatogenik hücrelerde indüklenen otofajinin, apoptozis-inhibitif aktiviteler ile çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında sitoprotektif bir rol oynadığını göstermektedir.[22]

Erkek üreme sistemi üzerindeki elektromanyetik alana maruz kalmanın DNA hasarı ve otofajiye neden olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Fare spermatositlerinden türetilen hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, LC3-II ifadesinde ve LC3-II/LC3-I oranında bir artış gözlenirken, nükleoporin proteini p62' nin ekspresyonunda bir azalma olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, manyetik alana maruz kalan spermatositlerde Reaktif Oksijen Radikallerinde artışa bağlı olarak AMPK/mTOR sinyal yolu üzerinden otofajide anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir.[23] Dondurma-çözdürme gibi spermatozoa üzerinde hasara neden olabilecek stres ortamlarında otofajik mekanizmasının spermatozoa üzerinde koruyucu etkisinin olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Stres koşullarında LC3-II ifadesindeki artışın sperm sağ kalımı ve hareketinin korunması ile ilişkili olduğu savunan çalışmalar mevcuttur. Farelerde yapılan bir çalışmada; tüm vücut ve skrotal ısı maruziyetinin, testis ağırlığı, oksidatif stres, apoptotik hücrelerinde gözlenen apoptozda artış ve germ hücrelerinin azalması dahil olmak üzere, farelerin

testislerine zararlı etkileriyle sonuçlandığını bildirilmiştir.[24] Geçici olarak ısıya maruz bırakılan fareler üzerine yapılan bir çalışmada da fare testislerinde otofajik belirteçleri incelenmiş ve çalışmanın sonucunda, tüm vücudun maruz kaldığı ısı maruziyetinin Nrf2 antioksidan sistemini ve otofajik değişimini tetiklediği, sitoplazma p62 proteinini biriktiren ve Nrf2 antioksidatif sistemi aktive eden otofajik inhibisyonu ile otofajik indüksiyonunu tetiklediği ve otofajik indüksiyonunun mTOR'undisregülasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir.[25]

Sonuç

Son dönemde, spermatogenik kök hücreler, spermatogonium, spermatosit ve spermatozoa dahil olmak üzere, spermatogenik hücreler üzerindeki otofajinin etkilerini ve altta yatan mekanizmalarını fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında göstermeyi hedefleyen çalışmalar hızla literatüre eklenmektedir. İlerleyen çalışmalarda otofajik yollarının daha ayrıntılı olarak incelenmesi, farklı otofajik belirteçlerinin RT-q-PCR gibi moleküler yöntemlerle de incelenerek desteklenmesi otofajik mekanizması ile diğer programlı ölüm mekanizmalarının erkek üreme sistemindeki yerinin daha iyi anlaşılması, birbiri ile ilişkilerinin karşılaştırılması olarak incelenmesi erkek üreme sisteminde meydana gelen moleküler bozulmalar ile otofajik ilişisine daha çok açıklık getirecek olup yeni teşhis ve tedavi yöntemlerinin önünü açacaktır.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Bu çalışma Türkiye Çocuk Endokrinoloji ve Diyabet Derneği tarafından maddi olarak desteklenmiştir. Yazarın herhangi bir çıkar dayalı ilişkisi yoktur.

Kaynaklar

1. Eskandari M, Ghalyanchi Langeroudi A, Zeighami H, Rostami A, Kazemi M, Eyni H, Shokri S. Co-administration of ginseng and ciprofloxacin ameliorates epididymo orchitis induced alterations in sperm quality and spermatogenic cells apoptosis following infection in rats. *Andrologia* 2017; 49-3.
2. Lin CY, Chen CY, Yu CH, Yu IS, Lin SR, Wu JT, Lin YH, Kuo PL, Wu JC, Lin SW. Human X-linked intellectual disability factor CUL4B is required for post-meiotic sperm development and male fertility. *Sci Rep* 2016; 6: 1-17.
3. Powell MJ, Casimiro MC, Cordon-Cardo C, He X, Yeow WS, Wang C, McCue PA, McBurney MW, Pestell RG. Disruption of a Sirt1-dependent autophagy checkpoint in the prostate results in prostatic intraepithelial neoplasia lesion formation. *Cancer Res* 2011;71: 964-75.
4. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like

- systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 211-6.
5. İzmirli M, Ecevit H, Göğebakan B. Autophagy to Survive, *Archives Medical Review Journal*. 2014; 23: 411-9
 6. Ross HM, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile Çeviri Editörü: Barış Baykal* 6. baskı. 2014: 784-809.
 7. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık, Ankara 2006; 1: 672-683.
 8. Griswold MD. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiol Rev* 2016; 96:117.
 9. Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of Cell Science* 2011 124: 161-70.
 10. Endo T, Romer KA, Anderson EL, Baltus AE, de Rooij DG, Page DC. Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 2347-56.
 11. Smith LB. Nonclassical testosterone signaling: a new pathway controlling spermatogenesis? *Biol Reprod* 2016; 1-2.
 12. Aparicio IM, Espino J, Bejarano I, Gallardo-Soler A, Campo ML, Salido GM, Pariente JA, Peña FJ, Tapia JA. Autophagy-related proteins are functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility. *Scientific Reports* 2016; 6: 33647-54.
 13. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Warabi E, Uwayama T, Ezaki J, Ueno T, Hara T, Sou Y. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007; 14: 1149-63.
 14. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Mazure MN. Hypoxia-induced autophagy is mediated through Hypoxia-Inducible Factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell Biol*. 2009; 29: 2570-81.
 15. Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008; 15: 171-82.
 16. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptation. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1102-9.
 17. Arslan DÖ, Korkmaz G, Gözüaçık D. Otofaji: Bir Hüresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2011, 2: 184-94.
 18. Zhang M, Jiang M, Bi Y, Zhu H, Zhou Z, Sha J. Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice. *Plos One*.2012; 7: 7.
 19. Gallagher LE, Williamson LE, Chan EY. Advances in autophagy regulatory mechanisms. *Cells* 2016; 5: 1–30.
 20. Liu ML, Wang JL, Wei J, Xu LL, Yu M, Liu XM, Ruan WL, Chen JX. Tri-ortho-cresyl phosphate induces autophagy of rat spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2015; 149:163-70.
 21. Xu LL, Liu ML, Wang JL, Yu M, Chen JX. Saligenin cyclic-o-tolyl phosphate (SCOTP) induces autophagy of rat spermatogonial stem cells. *Reprod Toxicol* 2016; 60: 62–8.
 22. Mancilla H, Maldonado R, Cereceda K, Villaruel-Espindola F, Montes de Oca M, Angulo C, Castro MA, Slebe JC, Vera JC, Lavandero S, Concha II. Glutathione depletion induces spermatogonial cell autophagy. *J Cell Biochem* 2015; 116: 2283–92.
 23. Liu K, Zhang G, Wang Z, Liu Y, Dong J, Dong X, Liu J, Cao J, Ao L, Zhang S. The protective effect of autophagy on mouse spermatocyte derived cells exposure to 1800MHz radiofrequency electromagnetic radiation. *Toxicol Lett* 2014; 228: 216-22.
 24. Li L, Chen Y, Gibson SB. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cellular Sign*. 2013; 25: 50-65.
 25. Li Z, Li Y, Zhou X, Dai P, Li C. Autophagy involved in the activation of the Nrf2-antioxidant system in testes of heat-exposed mice. *Journal of Thermal Bio*. 2018; 71: 142-52.