



Pontificia Universidad Católica de Chile  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Mención Ciencias Fisiológicas

**TESIS DOCTORAL:**

**“ADAM17 PARTICIPA EN LA APOPTOSIS FISIOLÓGICA E INDUCIDA POR  
XENOESTRÓGENOS DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS”**

Por

**PAULINA ANDREA URRIOLA MUÑOZ**

Octubre 2015



Pontificia Universidad Católica de Chile  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Mención Ciencias Fisiológicas

**“ADAM17 PARTICIPA EN LA APOPTOSIS FISIOLÓGICA E INDUCIDA POR  
XENOESTRÓGENOS DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS”**

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los  
requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas Mención  
Ciencias Fisiológicas

Por

**PAULINA ANDREA URRIOLA MUÑOZ**

Director de Tesis: Dr. Ricardo Moreno M.

Comisión de Tesis: Dra. Marcela Hermoso R.  
Dr. Rodrigo Iturriaga A.  
Dra. María Paz Marzolo C.  
Dr. Juan Carlos Sáez C.

Octubre 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Moreno y a todos los miembros del laboratorio, tanto los que ya no se encuentran como los actuales, por brindarme las herramientas y el apoyo necesario para crecer profesionalmente durante estos siete años de actividad científica. También, quisiera agradecer al Dr. Blobel y a sus colaboradores, por recibirme en su laboratorio y permitir el desarrollo de una parte importante de mi tesis doctoral.

Sumo a los agradecimientos a los profesores, investigadores, alumnos y personal de la Unidad de Endocrinología y Reproducción del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas por toda la ayuda y buena disposición entregada durante este tiempo.

No puedo dejar fuera de los agradecimientos a mi familia, principalmente padres y hermano, por entregarme los valores necesarios para ser la persona que soy ahora, y apoyarme incondicionalmente en todos los desafíos que me he propuesto. Especialmente quiero agradecer a Raúl Lagos Cabré, quien ha sido mi pilar fundamental en todo el camino del doctorado y en mi vida, por brindarme su apoyo incondicional y entregarme críticas constructivas para crecer como investigadora.

Finalmente, agradezco a todas las entidades que brindaron los recursos necesarios para realizar la investigación de esta tesis doctoral, como a CONICYT por haberme otorgado la Beca de Doctorado Nacional N° 21110211 junto con los beneficios de gastos operacionales y pasantía en el extranjero; al proyecto FONDECYT N° 1110778 del Dr. Moreno; y a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

## ÍNDICE DE MATERIAS

AGRADECIMIENTOS .....	2
ÍNDICE DE MATERIAS .....	4
ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
RESUMEN .....	14
ABSTRACT.....	17
INTRODUCCIÓN .....	20
Espermatogénesis en mamíferos .....	21
Mecanismos generales de la apoptosis.....	23
La apoptosis durante la espermatogénesis de mamíferos .....	24
Estructura de las proteínas ADAMs.....	25
Regulación de la localización y activación de ADAM17 .....	26
Respuesta a xenoestrógenos en células germinales .....	29
Planteamiento del Problema.....	32
Hipótesis.....	32
Objetivo General .....	32
Objetivos Específicos.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
RESULTADOS .....	50
1. Determinar la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas meióticas y post-meióticas sobre la apoptosis de estas células <i>in vivo</i> .....	50
2. Evaluar la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas meióticas y post-meióticas sobre la apoptosis de estas células inducida por los xenoestrógenos BFA y NF <i>in vivo</i> .....	77

3. Determinar el efecto de los xenoestrógenos BFA y NF sobre la actividad de la ADAM17. ....	86
4. Estudiar <i>in vitro</i> la presencia de la ADAM17 sobre la apoptosis inducida por BFA y NF en líneas celulares. ....	125
DISCUSIÓN .....	132
La ausencia de la ADAM17 en células germinales masculinas meióticas y post-meióticas provoca alteraciones histológicas en la espermatogénesis y desregulación de hormonas reproductivas .....	132
La ablación de la ADAM17 en células germinales masculinas meióticas y post-meióticas previene la apoptosis fisiológica en células germinales.....	139
La ADAM17 participa en la apoptosis inducida por los xenoestrógenos Bisfenol A y 4-Nonilfenol .....	145
Los xenoestrógenos Bisfenol A y 4-Nonilfenol inducen activación de la ADAM17 dependiente de iRhom2.....	150
Los xenoestrógenos Bisfenol A y 4-Nonilfenol inducen activación de diferentes proteínas quinasa.....	156
CONCLUSIÓN.....	160
APÉNDICE A.....	163
BIBLIOGRAFÍA .....	164

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Generación de ratones *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>.
- Figura 2: Genotipo de ratones.
- Figura 3: Localización de ADAM17 en testículo de ratón.
- Figura 4: Localización de ADAM17 en espermatozoide de ratón.
- Figura 5: Niveles proteicos de ADAM17 en espermaticitos y espermatozoides aislados de ratón.
- Figura 6: Disminución del porcentaje del peso relativo testicular en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> a los 21 y 60 días.
- Figura 7: La ausencia de la ADAM17 en células germinales post-meióticas masculinas provoca alteraciones histológicas en el epitelio del túbulo seminífero.
- Figura 8: La ausencia de la ADAM17 en células germinales meióticas y post-meióticas masculinas provoca alteraciones en los parámetros histológicos del testículo.
- Figura 9: La ausencia de ADAM17 en células germinales masculinas meióticas y post-meióticas altera los niveles en suero de la hormona testosterona y estradiol.
- Figura 10: Disminución del índice apoptótico en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>.
- Figura 11: Disminución de células caspasa-3 activa positiva en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>.

- Figura 12: Disminución de concentración de espermatozoides en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>.
- Figura 13: Reacción del acrosoma espontánea e inducida en ratones wild type, Stra8Cre;ADAM17<sup>+/loxΔ</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>.
- Figura 14: BFA y NF inducen muerte celular en testículo de ratón.
- Figura 15: En ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> la muerte de células germinales masculinas inducida por BFA y NF es prevenida.
- Figura 16: La muerte de células germinales masculinas inducida por BFA y NF es prevenida en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>.
- Figura 17: La muerte, determinada por el ensayo de TUNEL, de células germinales masculinas inducida por BFA y NF es prevenida en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>.
- Figura 18: Esquema representativo de la forma de medición de la liberación de fosfatasa alcalina.
- Figura 19: Expresión de la metaloproteasa ADAM17 en la línea celular GC-1.
- Figura 20: Expresión de neuregulina β1 de forma endógena y 24 horas después de la transfección en células GC-1.
- Figura 21: BFA y NF inducen liberación de FA endógena desde las células GC-1.
- Figura 22: BFA y NF inducen un aumento del porcentaje de células azul tripán positivas.
- Figura 23: Expresión de la metaloproteasa ADAM17 en las líneas celulares TM4 y LnCap.
- Figura 24: Expresión de neuregulina β1 de forma endógena y 24 horas después de la transfección en células TM4 y LnCap.
- Figura 25: Zeocina disminuye la viabilidad celular de la línea celular LnCap.

- Figura 26: BFA y NF inducen desprendimiento de neuregulina  $\beta 1$  desde las células TM4 transfectadas.
- Figura 27: NF induce un aumento del porcentaje de células azul tripán positivas.
- Figura 28: BFA y NF inducen desprendimiento de neuregulina  $\beta 1$  desde las células LnCap transfectadas.
- Figura 29: BFA y NF induce desprendimiento de neuregulina desde la hora en células TM4 y desde las 3 horas en células LnCap.
- Figura 30: ADAM17 participa en el desprendimiento de neuregulina inducido por BFA y NF en células TM4.
- Figura 31: ADAM17 participa en el desprendimiento de neuregulina y  $TNF\alpha$  inducido por BFA y NF en células LnCap.
- Figura 32: BFA y NF inducen desprendimiento de  $TGF\alpha$  y HB-EGF en células mEFs.
- Figura 33: El desprendimiento de HB-EGF y  $TGF\alpha$  inducido por BFA es dependiente de ADAM17.
- Figura 34: El desprendimiento de HB-EGF y  $TGF\alpha$  inducido por NF es dependiente de ADAM17.
- Figura 35: El desprendimiento de HB-EGF y  $TGF\alpha$  inducido por BFA y NF es independiente de iRhom1.
- Figura 36: iRhom2 es requerida para el desprendimiento de HB-EGF inducida por BFA pero no por NF.
- Figura 37: El desprendimiento de BTC es inducido por NF sólo cuando está ausente ADAM17 o ADAM17 madura.
- Figura 38: BFA y NF inducen la fosforilación de diferentes quinasa.

Figura 39: Esquema de posibles vías de señalización inducidas por BFA y NF.

Figura 40: ADAM17 participa en el aumento de PARP clivado inducido por BFA y NF en las células TM4 y LnCap.

Figura 41: ADAM17 participa en la apoptosis inducida por BFA y NF en las células TM4.

Figura 42: ADAM17 participa en la apoptosis inducida por BFA y NF en las células LnCap.

Figura 43: Modelo de acción de BFA y NF en la inducción de apoptosis.

Figura 44: Esquema representativo de la interacción entre célula germinal y célula de Sertoli mediada por la ADAM17.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM:	A Desintegrin And Metalloprotease
ADAM17:	A Desintegrin And Metalloprotease 17
ADAM17KO-GC:	Ratón <i>knock out</i> de ADAM17 en las células germinales meióticas y post-meióticas
AMPK $\alpha$ 2:	AMP-Activated Protein Kinase
(AP)-NRG $\beta$ 1:	Plasmidio que codifica una proteína de NRG $\beta$ 1 fusionada a fosfatasa alcalina
(AP)-TNF $\alpha$ :	Plasmidio que codifica una proteína de TNF $\alpha$ fusionada a fosfatasa alcalina
ARKO:	Ratón <i>knock out</i> para el receptor de la aromatasa
SCARKO:	Ratón <i>knock out</i> para el receptor de la aromatasa en células de Sertoli
BAK:	Bcl-2 homologous Antagonist Killer
BAX:	BCL-2-associated X protein
BCL-2:	B-Cell Lymphoma-2
BFA:	Bisfenol A
BTC:	Betacelulina
Chk-2:	Check point Kinase 2
CREB:	cAMP response element-binding
dATP:	Deoxyadenosine triphosphate

DISC:	Death Inducing Signaling Complex
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
eNOS:	Endothelial Nitric Oxide Synthase
ER $\alpha$ :	Estrogen Receptor $\alpha$
ER $\beta$ :	Estrogen Receptor $\beta$
ERK1/2:	Extracellular signal-regulated kinase
FA:	Fosfatasa Alcalina
FSH:	Follicle-Stimulating Hormone
GnRH:	Gonadotropin-Releasing Hormone
GPCRs:	G Protein-Coupled Receptors
HB-EGF:	Heparin-binding EGF-like growth factor
HDL:	High Density Lipoprotein
Hsp27:	Heat Shock Protein 27
IL-1:	Interleuquina-1
JAK:	Janus Kinase
KitL2:	Kit Ligand 2
LH:	Luteinizing Hormone
MAD2:	Mitotic Arrest Deficient 2
MAPKs:	Mitogen-Activated Protein Kinase
mEFs:	mouse Embryonic Fibroblasts
MEHP:	Mono-(2-ethylhexyl)phthalate
NF:	4-Nonilfenol
NRG $\beta$ 1:	Neuregulina $\beta$ 1

PARP:	Poli ADP-Ribosa Polimerasa
PAS-He:	Periodic Acid-Schiff-Hematoxilina
P4:	Progesterona
PKC $\alpha$ :	Protein Kinase C $\alpha$
PKC $\delta$ :	Protein Kinase C $\delta$
PMA:	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RA:	Reacción Acrosomal
RIA:	Radio Immuno Assay
ROS:	Reactive Oxigene Species
RT-PCR:	Reverse Transcription -Polymerase Chain Reaction
SCF:	Stem Cell Factor
SH3:	Src-Homology 3
shRNA:	short hairpin RNA
STAT:	Signal Transducer and Activator of Transcription
Stra8:	Stimulated by Retinoic Acid 8
TACE:	Tumor necrosis $\alpha$ Converting Enzyme
TGF $\alpha$ :	Transforming Growth Factor $\alpha$
TGF $\beta$ :	Transforming Growth Factor $\beta$
TIMP-1:	(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1)
TNF $\alpha$ :	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TNFR1:	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRAIL:	Tumor Necrosis Factor Apoptosis Inducing Ligand
TUNEL:	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

VCAM-1:           Vascular Cell Adhesion Molecule 1

## RESUMEN

La apoptosis en células germinales es fundamental en la regulación de la producción diaria de espermatozoides, y se lleva a cabo tanto en condiciones fisiológicas como inducidas por agentes externos como lo son los genotóxicos, que dañan al DNA, y xenoestrógenos, que imitan a los estrógenos endógenos. Se sabe que los xenoestrógenos como Bisfenol A (BFA) y 4-Nonilfenol (NF) inducen un incremento del índice apoptótico en células de testículos de ratas y ratones y una baja producción de espermatozoides en estos animales. Sin embargo, el mecanismo que subyace a este efecto es desconocido.

La ADAM17 (*A Desintegrin And Metalloprotease-17*) es una metaloproteasa de transmembrana relevante en la señalización paracrina/yuxtacrina y autocrina. En nuestro laboratorio se ha mostrado que la inhibición farmacológica de la ADAM17 disminuye la apoptosis de células germinales masculinas tanto en condiciones fisiológicas como en la inducida por drogas anticancerígenas y xenoestrógenos. Sin embargo, aún se desconoce si la presencia de la ADAM17 en las células germinales es fundamental en la apoptosis de estas células. Es por ello, se propuso la siguiente hipótesis: La presencia de ADAM17 es necesaria para la apoptosis de células germinales masculinas tanto fisiológica como inducida por los xenoestrógenos BFA y NF durante la espermatogénesis del ratón. En donde se plantearon 4 objetivos específicos: (1) Determinar la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas meióticas y post-meióticas sobre la apoptosis de estas células *in vivo*, (2) Evaluar

la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas meióticas y post-meióticas sobre la apoptosis de estas células inducida por los xenoestrógenos BFA y NF *in vivo*, (3) Determinar el efecto de los xenoestrógenos BFA y NF sobre la actividad de la ADAM17 y (4) Estudiar *in vitro* la participación de la ADAM17 sobre la apoptosis inducida por BFA y NF en líneas celulares.

Para esto, se creó un ratón *knock out* condicional para la ADAM17 en células germinales masculinas utilizando la tecnología Cre-LoxP. En estos ratones se observó que la apoptosis fisiológica e inducida por los xenoestrógenos BFA y NF disminuyó significativamente en relación a los silvestres cuando se evaluó el número de células caspasa-3 activa mediante inmunofluorescencia, el número de células picnóticas por tinción Pas-He, y el porcentaje de células TUNEL positivas. Usando estos ratones se estableció que la presencia de la ADAM17 es fundamental en la apoptosis de células germinales masculinas tanto en condiciones fisiológicas como inducida por BFA y NF. Además, se determinó la participación de esta metaloproteasa en el desarrollo de la espermatogénesis. Para ello, se calculó el porcentaje del peso testicular en comparación al peso corporal a los 21 y 60 días de edad, donde se observó una disminución significativa de este en ratones *knock out* respecto a los *wild type*. Esto puede ser explicado por la disminución en los parámetros histológicos del testículo, como la altura del epitelio, diámetro de los túbulos seminíferos y del lumen de los túbulos seminíferos observado en los ratones *knock out* respecto a los *wild type*.

Por otro lado, para dilucidar si BFA y NF inducen actividad metaloproteasa de la ADAM17 (lo cual sería fundamental para la muerte de las células germinales) se creó un

sistema *in vitro* en el cual se expresó una proteína que tiene el dominio intracelular, el de transmembrana y parte del dominio extracelular de 5 sustratos de la ADAM17 fueron fusionados con fosfatasa alcalina (FA). Estos sustratos son Neuregulina  $\beta$ 1 (NRG $\beta$ 1), Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), Kit Ligand 2 (KitL2), o Transforming Growth Factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ). Este sistema *in vitro* fue expresado en líneas celulares de células de Sertoli de ratón (TM4), en células de cáncer de próstata humana (LnCaP), o en células de fibroblasto de embrión de ratón (mEFs). De esta manera, se midió la liberación de fosfatasa alcalina al medio de cultivo (mediante la actividad de FA), lo que indirectamente refleja la actividad metaloproteasa de la ADAM17. Usando este sistema *in vitro*, se demostró que la inhibición farmacológica y/o genética (*knockdown*) de la ADAM17 previene la liberación de FA inducida por BFA o NF. Además, utilizando células mEFs que pierden iRhom1 y/o iRhom2 (proteínas inactivadas de la familia romboide) se determinó que la activación de ADAM17 inducida por BFA y NF depende de iRhom2 pero no de iRhom1. Por último, mediante los niveles proteicos del fragmento de 86 kDa de PARP (sustrato de caspasa-3) evaluados por *western blot*; el porcentaje de la población de células sub-G1 y de células Anexina V evaluadas por citometría de flujo se determinó que la inhibición genética de la ADAM17 previene la muerte celular inducida por BFA y NF.

En conclusión la ADAM17 participa en la apoptosis de células germinales tanto fisiológica como inducida por los xenoestrógenos BFA y NF durante la espermatogénesis del ratón.

## ABSTRACT

Germ cell apoptosis is crucial in regulating the daily sperm production, and it takes place both in physiological conditions and is induced by external agents such as genotoxic which damage DNA and xenoestrogens that mimic endogenous estrogens. Xenoestrogens, such as Bisphenol A (BPA) and 4-nonylphenol (NP) induce an increase in apoptotic index in testicular cells of rats and mice and a low sperm production in these animals. However, the underlying mechanism of this effect is unknown.

ADAM17 (A Disintegrin And Metalloprotease-17) is a transmembrane metalloproteinase involved in paracrine/juxtacrine and autocrine signaling. Our laboratory has shown that pharmacological inhibition of ADAM17 decreases male germ cell apoptosis both in physiological conditions and induced by anticancer drugs or xenoestrogens. However, it remains unknown whether the presence of ADAM17 in germ cells is critical in the apoptosis of these cells. Therefore, the following hypothesis has been proposed: the presence of ADAM17 is required for apoptosis of male germ cells in both physiological and NP/BPA-induced conditions during mouse spermatogenesis. Four aims were set: (1) To determine whether ablation of ADAM17 in male germ cells (AD17KO-GC) prevents apoptosis of germ cells *in vivo*. (2) To evaluate whether BPA or NP induce apoptosis in male germ cells in AD17KO-GC mice. (3) To determine whether BPA and NP induce activation of ADAM17 in germ cell and Sertoli cell lines of mouse origin. (4) To study whether the presence of

ADAM17 is required for apoptosis of germ and Sertoli cell lines of mouse origin when induced by BPA and NP *in vitro*.

For this, a conditional ADAM17 *knock out* mouse in male germ cells was created using the Cre-LoxP technology. In these mice it was observed that the physiological and NP/BPA-induced apoptosis was significantly decreased versus the *wild type* mice when evaluating the number of active caspase-3 cells by immunofluorescence, the number of pyknotic cells by Pas-He staining, and the percentage of TUNEL positive cells. Using these *knock out* mice it was established that the presence of ADAM17 is critical in male germ cell apoptosis both in physiological and BPA/NP-induced conditions. Furthermore, the involvement of this metalloprotease in the spermatogenesis development was also determined. To accomplish this, the percentage of the testicular weight compared to body weight was calculated at 21 and 60 days of age, showed a significant decrease in the *knock out* mice compared to *wild type*. This can be explained by the decrease in testicular histological parameters such as height of the epithelium, seminiferous tubules diameter and lumen of the seminiferous tubules observed in *knock out* mice compared to *wild type*.

Moreover, to elucidate whether BPA and NP induce metalloprotease activity of ADAM17 (which would be essential for the death of germ cells) an *in vitro* system was created, in which a protein with the intracellular domain, the transmembrane and extracellular domain of 5 substrates of ADAM17 are fused to alkaline phosphatase (AP). These substrates are the  $\beta$ 1-neuregulin (NRG $\beta$ 1), Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF), Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), Kit Ligand 2 (KitL2), or transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ). This

*in vitro* system was expressed in Sertoli cell lines (TM4), human prostate cancer cells (LnCaP) or mouse embryo fibroblasts (mEFs). Thus, the release of AP into the culture medium was measured (by AP activity), which indirectly reflects the ADAM17 metalloprotease activity. Using this *in vitro* system, it was showed that the pharmacological and/or genetic inhibition (*knockdown*) of ADAM17 prevents the AP release induced by BPA or NP. In addition, using mEFs cells lacking iRhom1 and/or iRhom2 (inactivated rhomboid family proteins) it was determined that activation of ADAM17 by NP and BPA was dependent of iRhom2 but not iRhom1. Finally, protein levels of the 86 kDa-fragment of PARP (caspase-3 substrate), the percentage of the sub-G1 population and annexin V cells were evaluated and it was determined that genetic inhibition of ADAM17 prevents cell death induced by BPA and NP.

In conclusion, ADAM17 participates in the physiological and xenoestrogen-induced apoptosis during mouse spermatogenesis.

## INTRODUCCIÓN

La apoptosis de células germinales durante la espermatogénesis en mamíferos es un proceso fisiológico que elimina las células dañadas y controla la producción de espermatozoides (Rodríguez et al., 1997; Feng et al., 1999; Moreno et al., 2006). Un incremento en la tasa de apoptosis genera una disminución de espermatozoides lo que repercute directamente en la fertilidad masculina (Feng et al., 1999; Huynh et al., 2002; Weikert et al., 2004; WHO, 2010a). Diversos estímulos biológicos, físicos y químicos tales como drogas, radiación, patologías reproductivas, somáticas y contaminantes ambientales como los xenoestrógenos pueden inducir un aumento en la apoptosis y disminución en la producción de espermatozoides (Tripathi et al., 2009; Moreno et al., 2011b). Incluso, la disminución en la producción global de espermatozoides desde 1940 hasta hoy en día, se asocia a un aumento sostenido en los xenoestrógenos medioambientales (Sinawat, 2000). La apoptosis en la espermatogénesis ha sido ampliamente estudiada, pero el mecanismo por el cual se induce bajo condiciones fisiológicas o patológicas no es completamente entendido, y los conocimientos de los mecanismos moleculares en estos procesos podrían ayudar a desarrollar nuevas herramientas farmacológicas para la infertilidad e incluso la anticoncepción masculina.

La ADAM17 (*A Desintegrin And Metalloprotease-17*) es una proteasa de transmembrana que regula la liberación de diversos ligandos, citoquinas y ectodomios de receptores desde la superficie celular. Esta enzima se expresa de manera diferencial en las

células germinales durante la espermatogénesis y podría ser un inductor de la apoptosis tanto en condiciones fisiológicas como inducidas por estímulos externos (Lizama et al., 2010; Lizama et al., 2012). Sin embargo, se desconoce el mecanismo de cómo se regula el desprendimiento del dominio extracelular de los distintos sustratos de la ADAM17, a pesar de ser importante en las vías de señalización paracrina/yuxtacrina y autocrina en el tracto reproductor masculino. Es por ello, que en esta tesis se evaluó si la presencia de ADAM17 es importante en la apoptosis de células germinales tanto en condiciones fisiológicas como aquellas inducidas por los xenoestrógenos Bisfenol A (BFA) y 4-Nonilfenol (NF).

A continuación se entregarán diferentes antecedentes que describirán la espermatogénesis en mamíferos y la apoptosis durante este proceso, las proteínas ADAMs, para finalmente discutir los efectos de los xenoestrógenos durante la espermatogénesis y su participación en la inducción de la apoptosis mediada por la ADAM17.

### **Espermatogénesis en mamíferos**

En el epitelio del túbulo seminífero ocurre la espermatogénesis, proceso de generación de espermatozoides, formados a partir de células troncales diploides conocidas como espermatogonias. Estas espermatogonias se dividen constantemente por mitosis, y algunas de las células hijas entran en meiosis dando origen a los espermatoцитos primarios. Al finalizar el proceso meiótico se originan células haploides conocidas como espermátidas, las cuales, luego del proceso conocido como espermiogénesis, generan los espermatozoides. Todo el proceso

culmina con la liberación del espermatozoide al lumen del túbulo seminífero (espermiación) para su posterior maduración en el epidídimo (Hermo et al., 2010).

La espermatogénesis se encuentra regulada por señales endocrinas como GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone), LH (Luteinizing Hormone), FSH (Follicle-Stimulating Hormone), testosterona, estrógenos e inhibinas; proteínas como caderina, catenina, laminina, integrina, entre otras y citoquinas como TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ , SCF (Stem Cell Factor), etc. (Holdcraft and Braun, 2004; Walker, 2009; Cheng et al., 2010). Las células somáticas ubicadas al interior del túbulo seminífero y encargadas de la mantención de la espermatogénesis son las células de Sertoli. Estas células secretan diferentes factores tróficos como SCF, el cual es un ligando que al unirse a su receptor c-kit expresado por las células germinales promueve sobrevivencia de estas células (Yan et al., 2000b). Por otro lado, las células de Leydig se ubican en el intersticio fuera del túbulo seminífero y son las encargadas de secretar testosterona, hormona esencial para el desarrollo de la espermatogénesis, debido a su participación en la inducción de la meiosis y la subsecuente diferenciación de espermátidas (McLachlan et al., 2002; De Gendt et al., 2004). La testosterona ejerce su acción a través de la célula de Sertoli (la que expresa el receptor de andrógeno), y estimula la síntesis de varias proteínas y factores tróficos en periodos específicos de la espermatogénesis (Wang et al., 2009). Por otro lado, se ha mostrado que la apoptosis de células germinales es controlada por los niveles hormonales incluyendo la testosterona, estrógeno y FSH (Shetty et al., 1996; Tesarik et al., 2002). Por lo tanto, una desregulación a nivel hormonal o de citoquinas generará una interrupción en la espermatogénesis a través de apoptosis.

## **Mecanismos generales de la apoptosis**

La apoptosis es un mecanismo regulado de muerte celular que se caracteriza por la fragmentación del DNA, activación de caspasas y externalización de fosfatidilserina (Degterev and Yuan, 2008; Youle and Strasser, 2008). De manera general, existen dos vías de activación de la apoptosis; una vía extrínseca y una vía intrínseca. La primera es iniciada por activación de receptores de muerte como Fas (CD95/Apo-1) o TNF-1 (TNFR1, Tumor Necrosis Factor Receptor 1), los cuales al trimerizar en respuesta a la unión de sus ligandos, induce la formación de un complejo multimérico denominado DISC (Death Inducing Signaling Complex), el cual activa a la procaspasa-8 en ratones y a la procaspasa-8 y -10 en humanos (Scaffidi et al., 1998; Salvesen, 2002; Henkler et al., 2005). Las caspasas-8 y/o -10, procesan proteolíticamente a la procaspasa-3, -6 y -7, siendo la caspasa-3 la principal caspasa ejecutora.

Por otra parte, la vía intrínseca puede ser activada por diferentes estímulos como radiación, fragmentación del DNA o estrés oxidativo (Gong and Han, 2006; Sola et al., 2007; Degterev and Yuan, 2008; Ortiz et al., 2009), lo que conllevan a una disminución del potencial de membrana mitocondrial y una liberación del citocromo-c desde la mitocondria, lo cual, junto con dATP, la proteína citosólica Apaf-1 y procaspasa-9 forman un complejo llamado apoptosoma. Dentro de este complejo, la procaspasa-9 se activa y consecuentemente activa a procaspasa-3 conectándose tanto la vía intrínseca como extrínseca (Shi, 2002, 2006). La caspasa-3 es responsable de la degradación de varias proteínas intracelulares como lamina nuclear, actina y Poli ADP-Ribosa Polimerasa (PARP) (Duriez and Shah, 1997; Riedl and Shi, 2004; Sola et al., 2007; Feinstein-Rotkopf and Arama, 2009).

La estabilidad de la membrana mitocondrial es preservada por proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (B-Cell Lymphoma-2) que interactúan con y reprimen la actividad de proteínas pro-apoptóticas (Chen et al., 2005; Zhai et al., 2008; Ku et al., 2011). Por otro lado, las proteínas multidominio pro-apoptóticas como Bax (BCL-2-associated X protein) y Bak (Bcl-2 homologous Antagonist Killer) son cruciales para la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria y la subsecuente liberación del citocromo-c (Riedl and Shi, 2004; Westphal et al., 2011). Por lo tanto, la apoptosis es un proceso complejo que involucra la activación de vías independientes pero convergentes con el fin de inducir muerte celular.

### **La apoptosis durante la espermatogénesis de mamíferos**

La apoptosis de células germinales es importante para el buen desarrollo de la espermatogénesis en condiciones fisiológicas (Feng et al., 1999; Yan et al., 2000a; Moreno et al., 2006). Durante la primera onda de la espermatogénesis de rata hay una masiva muerte de células germinales, principalmente espermatocitos en paquiteno, alrededor de los 25 días edad. Esta muerte de células germinales continúa durante cada ciclo de espermatogénesis durante toda la vida del macho. Se cree que la apoptosis en condiciones fisiológicas ocurre en aquellas células germinales producidas en exceso y que no pueden ser sustentadas por la célula de Sertoli, y además se eliminan las células dañadas (Rodriguez et al., 1997; Jahnukainen et al., 2004; Moreno et al., 2006). Resultados de nuestro laboratorio muestran un incremento en los niveles proteicos del receptor Fas, el factor de transcripción p53 y la activación de caspasa -8, -9, -3, -2 y -6 en las células germinales apoptóticas (Lizama et al., 2007; Codelia et al., 2008).

Queda en evidencia la importancia de la apoptosis durante la espermatogénesis cuando genes pro-apoptóticos son delecionados (Bax, Bim o Bik) o cuando genes anti-apoptóticos son sobreexpresados (Bcl-2), debido a que en ambos casos existe infertilidad por un arresto de la espermatogénesis en el comienzo de la meiosis (Knudson et al., 1995; Yamamoto et al., 2001; Russell et al., 2002; Yan et al., 2003; Coultas et al., 2005).

Por otro lado, la apoptosis durante la espermatogénesis puede ser estimulada por factores exógenos, ya que las células germinales en meiosis (espermatoцитos) son altamente sensibles a shock térmico, radiación, agentes quimioterapéuticos y xenoestrógenos (Russell, 2004; Bieber et al., 2006; Lizama et al., 2009; Silva et al., 2011). Además, drogas anticancerígenas como el etopósido inducen apoptosis en espermatoцитos por una sobrerregulación de p53, caspasas y de la metaloproteasa ADAM17 (Ortiz et al., 2009; Codelia et al., 2010; Lizama et al., 2011; Lizama et al., 2012).

### **Estructura de las proteínas ADAMs**

Las ADAMs son glicoproteínas de transmembrana tipo I con 7 dominios claramente definidos, que desde el N-terminal al C-terminal son: (1) El prodominio, que actúa como chaperona y es requerido para el tráfico intracelular (Milla et al., 1999; Leonard et al., 2005) y para la protección de la degradación intracelular del dominio metaloproteasa (Loechel et al., 1999; Roghani et al., 1999; Leonard et al., 2005). Este es removido por proteasas convertasas, como por ejemplo furina en la vía secretora (Nakayama, 1997). (2) El dominio metaloproteasa, que es responsable del procesamiento proteolítico de los sustratos de las ADAMs. La flexibilidad

conformacional de este dominio podría explicar la gran variedad de sustratos que posee cada miembro de la familia ADAM (Seals and Courtneidge, 2003; Sagi and Milla, 2008). Luego los dominios (3) el dominio desintegrina, (4) el dominio rico en cisteína y (5) el dominio tipo EGF (Epidermal Growth Factor), que pueden mediar interacciones célula-célula y célula-matriz por unión a integrinas y participar en la unión del sustrato a la ADAM (Blobel et al., 1992; Blobel, 1997; Reddy et al., 2000; Smith et al., 2002; Seals and Courtneidge, 2003; Li and Fan, 2004; Klein and Bischoff, 2011). Por último, los dominios (6) de transmembrana y (7) el citoplasmático. Este último tiene regiones SH3 (Src-homology 3) que permiten la interacción con distintas proteínas regulatorias y quinasas como PKC $\delta$  (Protein Kinase C- $\delta$ ) y Src (Kratzschmar et al., 1996; Weskamp et al., 1996; Izumi et al., 1998; Kang et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Poghosyan et al., 2002; Seals and Courtneidge, 2003; Yin and Yu, 2009). El dominio citoplasmático tiene un rol en la localización de la ADAM en la superficie celular y que además podría participar en la regulación de su actividad, tal como se mencionará más adelante (Cousin et al., 2000; Abram et al., 2003; Seals and Courtneidge, 2003).

### **Regulación de la localización y activación de ADAM17**

Hasta la fecha la familia ADAM tiene alrededor de 40 isoformas, pero sólo la mitad de ellas tiene actividad catalítica. La ADAM17 o TACE (*Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme*) se expresa constitutivamente en varios tejidos tales como ovario, testículo, próstata, corazón y riñón, y su expresión varía durante el desarrollo embrionario (Black et al., 1997; Moreno et al., 2011b; Urriola-Munoz et al., 2014b). La activación de la ADAM17 induce el desprendimiento del ectodominio de varias proteínas transmembrana, tales como neuregulina

(Montero et al., 2000; Horiuchi et al., 2005), EGF, TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ )(Sahin et al., 2004); citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-Alpha), su receptor TNFRI (Moss et al., 1997); y moléculas de adhesión como VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) (Garton et al., 2003), lo que indica su participación en las vías de señalización paracrina/yuxtacrina y autocrina.

La regulación de la activación de la ADAM17 es un tema candente de estudio y que aún no se resuelve. Algunos autores proponen que su localización en la superficie celular parece ser concomitante a su activación debido a que en reservorios vesiculares entre el trans-Golgi y la membrana plasmática se le remueve el prodominio. Este evento permite la activación de la ADAM17 y su consiguiente localización en balsas lipídicas en la superficie celular (Soond et al., 2005; Tellier et al., 2006; Killock and Ivetic, 2010; Xu and Derynck, 2010). Además, la ADAM17 es activada de manera directa o indirecta por especies reactivas de oxígeno (ROS), calcio intracelular (Hino et al., 1999; Fischer et al., 2004), proteínas quinasas como: (1) PKC $\alpha$  y PKC $\delta$  (Sahin et al., 2004; Kveiborg et al., 2011); (2) MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) como ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) (Fan and Derynck, 1999; Fan et al., 2003) y p38 (Diaz-Rodriguez et al., 2002; Soond et al., 2005; Killock and Ivetic, 2010; Xu and Derynck, 2010); y (3) la proteína quinasa Src (Maretzky et al., 2011), por receptores tirosina quinasa (Swendeman et al., 2008) y acoplados a proteína G (GPCRs, G Protein-Coupled Receptors por sus siglas en inglés) (Prenzel et al., 1999; Eguchi et al., 2001). Recientes trabajos han mostrado que la señalización de la ADAM17 también requiere de proteínas accesorias como iRhom1 y 2, miembros inactivos proteolíticamente de la familia romboide (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012; Li et al.,

2015) y anexinaA8 y A9 (Nakayama et al., 2012). Por otro lado, la ADAM17 forma homodímeros inactivos, y la fosforilación del dominio citoplasmático, dada por las quinasas mencionadas anteriormente, permitirían la separación de dichos dímeros y su consiguiente activación (Xu et al., 2012). Este modelo explicaría por qué la remoción del dominio intracelular permite la expresión de una enzima catalíticamente activa, debido a que esta no forma homodímeros.

La importancia de la ADAM17 durante el desarrollo embrionario se aprecia en los ratones que expresan la ADAM17 <sup>$\Delta$ Zn/ $\Delta$ Zn</sup> (ADAM17 sin actividad metaloproteasa), los que mueren entre el día embrionario 17,5 y el primer día después de nacidos. Estos ratones tienen falla en el cierre de los párpados, pérdida del epitelio conjuntivo, corneas delgadas, desorganización de los folículos pilosos (Peschon et al., 1998), y pérdida de peso debido a un hipermetabolismo (Gelling et al., 2008). Este fenotipo refleja los múltiples roles que tiene esta enzima durante el desarrollo normal. Por último, es importante mencionar que la ADAM17 se expresa de manera estadio específico durante la espermatogénesis de rata (Urriola-Munoz et al., 2014b) y que ratones *knock out* condicionales para la ADAM17 acoplados al promotor de *Sox9*, el cual es un gen ubicado en el cromosoma Y, y cuya expresión es esencial para inducir la diferenciación de células de Sertoli (células somáticas encargadas de la mantención y nutrición de las células germinales), son infértiles (Horiuchi et al., 2009). Esto último sugiere que la ADAM17 podría tener un papel importante en la célula de Sertoli, probablemente mediante la señalización para/juxtacrina con las células germinales.

## **Respuesta a xenoestrógenos en células germinales**

BFA y NF son los xenoestrógenos producidos en mayor volumen a nivel mundial como inductores de la polimerización, y se encuentran en los plásticos, juguetes, latas de conserva, cosméticos, etc. (Phillips and Tanphaichitr, 2008). Estos son compuestos artificiales que presentan similitud estructural y funcional con los estrógenos, y además tienen efectos estrogénicos por lo que desregulan el balance hormonal de animales y humanos, interrumpiendo así, reproductivos dependientes de estrógenos (Park et al., 2011). Sin embargo, los xenoestrógenos tienen una menor afinidad al receptor de estrógeno genómico (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) comparado con el 17 $\beta$  estradiol (Gould et al., 1998; ter Veld et al., 2006), pero aun así pueden afectar las funciones y desarrollo en los animales en bajas concentraciones. Es por ello que podrían tener una vía de acción independiente del receptor de estrógeno genómico por la cual los xenoestrógenos pueden actuar, sin embargo, esta vía aún se desconoce.

El incremento de xenoestrógenos en el medio ambiente ha generado preocupación sobre la importancia de estos en la salud humana, debido a que se han detectado en muestras humanas como el suero, la orina, el líquido amniótico, leche materna, semen, entre otros (Inoue et al., 2002; Calafat et al., 2005; Swan et al., 2005; Main et al., 2006). Y además han sido relacionados con una disminución en la distancia anogenital, en la calidad de los espermatozoides y en la fertilidad del hombre (Swan et al., 2005; Meeker et al., 2010).

Existe un gran volumen de información referente la disrupción que generan BFA y NF en la espermatogénesis de animales de estudio (Lagos-Cabre and Moreno, 2012). Se ha

observado una disminución del peso del testículo, el epidídimo y del recuento de espermatozoides en ratas tratadas con hasta 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de NF (Chitra et al., 2002). Además, se observó una disminución en el recuento y motilidad de espermatozoides en la adultez cuando a ratas machos son tratados desde 100 hasta 1600  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de BFA durante el período neonatal (Salian et al., 2009), concentraciones similares a las encontradas en plasma sanguíneo y líquido amniótico en humanos (1-2 ng/ml para BFA y 0,2-0,3 ng/ml para NF) (Ikezuki et al., 2002; Kawaguchi et al., 2004).

La disminución en el recuento del número de espermatozoides en ratas tratadas con xenoestrógenos se relaciona con un incremento en la apoptosis de células germinales. Prueba de esta apoptosis se ha observado por una activación de caspasa-3 en células germinales y de Leydig, una reducción en el número de células de Leydig que conlleva a una disminución en los niveles de testosterona plasmática, un incremento de los niveles de Fas en células germinales, y FasL en células de Sertoli y un aumento de células TUNEL positivas en testículos de ratas tratado con BFA y NF (Han et al., 2004; Toyama et al., 2004; Li et al., 2009). Respecto a los humanos, se ha observado una alta correlación entre los niveles de BFA en la orina y anomalías en los espermatozoides (motilidad, viabilidad, conteo y concentración de espermatozoides, y fragmentación del DNA), sugiriendo que estos xenoestrógenos inducen apoptosis de células germinales en el humano (Meeker et al., 2010; Li et al., 2011). Por lo tanto, dada la distribución ubicua de estos compuestos en los productos plásticos usados por los humanos, es importante clarificar sus mecanismos de acción y además para generar nuevas herramientas farmacológicas para la infertilidad.

Estos últimos antecedentes sugieren que habría una exacerbación de la apoptosis de células germinales inducida por BFA y NF en testículos de animales tratados y probablemente en humanos expuestos a estos compuestos. Resultados de nuestro laboratorio muestran un incremento de la muerte de células germinales y de forma concomitante un aumento de ROS y de p38 fosforilada en testículos de ratas de 21 días tratadas con 50 mg/kg de BFA y NF por 24 horas (Urriola-Munoz et al., 2014a). Además, se observó un incremento temprano del calcio intracelular en espermatozoides en paquitenio y en espermátidas redondas aisladas de testículo de rata adultas que fueron tratadas con 10  $\mu$ M de NF.

Por último, en nuestro laboratorio hemos observado que después de la exposición de ratas de 21 días a BFA o NF hay un incremento significativo de la ADAM17 en la membrana de células germinales, lo que implicaría una activación de esta; y también se ha observado que la mayoría de las células apoptóticas son células germinales positivas para la ADAM17, y al utilizar un inhibidor de esta metaloproteasa la muerte celular disminuye significativamente (Urriola-Munoz et al., 2014a). Es por ello, que nuestro modelo propone a la ADAM17 como un nuevo elemento en la apoptosis de células germinales inducida por BFA y NF.

## **Planteamiento del Problema**

Resultados de nuestro laboratorio indican que la inhibición farmacológica de la ADAM17 disminuye la apoptosis de células germinales masculinas tanto en condiciones fisiológicas como en la inducida por los xenoestrógenos BFA y NF. Sin embargo no hay estudios que indiquen que la presencia de la ADAM17 es fundamental en la apoptosis de estas células. Es por ello, que se estudió si la ADAM17 participa en la apoptosis de células germinales masculinas en condiciones fisiológicas e inducidas por BFA y NF, por lo que se propuso poner a prueba la siguiente hipótesis

## **Hipótesis**

La presencia de ADAM17 es necesaria en la apoptosis de células germinales masculinas tanto fisiológica como inducida por los xenoestrógenos BFA y NF durante la espermatogénesis del ratón.

## **Objetivo General**

Determinar el rol de la ADAM17 presente en las células germinales sobre la apoptosis fisiológica e inducida por BFA y NF durante la espermatogénesis del ratón.

## Objetivos Específicos

1. Determinar la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas meióticas y post-meióticas sobre la apoptosis de estas células *in vivo*.
  - 1.1. *Determinar la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas en la histología del túbulo seminífero.*
  - 1.2. *Determinar el efecto de la ADAM17 de las células germinales masculinas sobre los niveles séricos de testosterona y estradiol.*
  - 1.3. *Determinar la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas sobre la apoptosis fisiológica de células germinales in vivo.*
  
2. Evaluar la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas meióticas y post-meióticas sobre la apoptosis de estas células inducida por los xenoestrógenos BFA y NF *in vivo*.
  
3. Determinar el efecto de los xenoestrógenos BFA y NF sobre la actividad de la ADAM17.

*Generar líneas celulares estables que expresen sustratos específicos de la ADAM17.*

  - 3.2. *Determinar el efecto de BFA y/o NF sobre la liberación de fosfatasa alcalina al medio de cultivo en la línea celular que exprese establemente el sustrato de la ADAM17 acoplado a fosfatasa alcalina.*
  - 3.3. *Determinar la participación de la ADAM17 en la liberación de fosfatasa alcalina inducida por BFA y/o NF.*

*3.4. Determinar el rol de iRhom1 y/o iRhom2 en la liberación de fosfatasa alcalina inducida por BFA y/o NF.*

4. Estudiar *in vitro* la participación de la ADAM17 sobre la apoptosis inducida por BFA y NF en líneas celulares.

*4.1. Determinar si BFA y NF inducen apoptosis en las líneas celulares.*

*4.2. Determinar la participación de la ADAM17 sobre la apoptosis inducida por BFA y NF en las líneas celulares.*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Químicos y Anticuerpos*

Bisfenol A [2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane] (BFA) y 4-nonilfenol (NF) fueron obtenidos desde Sigma (St Louis, MO, USA). TRIzol, LipofectAMINE 2000, p-nitrophenyl phosphate (p-NPP), el sustrato de fosfatasa alcalina, fueron obtenidos desde Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El ensayo de TUNEL, transcriptasa reversa y PCR Master Mix fueron obtenidos desde Promega (MAdison, WI, USA). El anticuerpo policlonal contra ADAM17 hecho en conejo (ab39163) y el anticuerpo policlonal contra SCP-3 hecho en conejo (ab15093) fueron obtenidos desde Abcam (Cambridge, MA, USA), el anticuerpo policlonal contra PARP-1/2 (sc-7150) hecho en conejo fue obtenido desde Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), el anticuerpo policlonal contra caspasa-3 activa (Asp175, #9661) fue obtenido desde Cell Signaling (Danvers, MA, USA), el anticuerpo monoclonal contra  $\beta$ -actina hecho en ratón (AC-15) y el anticuerpo IgG-FITC en contra de conejo (F0382) fueron obtenidos desde Sigma (St Louis, MO, USA), los anticuerpos anti-ratón y anti-conejo fueron obtenidos desde KPL (Gaithersburg, MD, USA). El kit UltraVision Detection Systems anti-conejo y SYBR Safe™ DNA gel stain fueron obtenidos desde Thermo Scientific (Fremont, CA, USA). El kit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus fue obtenido desde PERkinElmer Inc. (Waltham, MA, USA).

### *Generación y mantención de ratones AD17KO-GC*

Los ratones Adam17<sup>tm1.2Bbl</sup>, cuyo gen flanqueado por LoxP es *adam17*, y ratones Tg(*Stra8-cre*)1Reb/J, donde la expresión de la enzima Cre está bajo el promotor del gen *stra8*, fueron adquiridos desde Jackson Lab, USA, gracias al proyecto Fondecyt 1110778. Los ratones fueron mantenidos en el Bioterio central de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se mantuvieron en un ciclo de 12L:12D con agua y comida *ad libitum*. El sacrificio de los animales fue realizado mediante dislocación cervical. Las investigaciones se llevaron a cabo en conformidad con las normas establecidas por la Comisión de bioética de nuestra Facultad y de la guía de manejo animal de CONICYT. Todos los protocolos de los animales fueron aprobados por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONDECYT). Primero se cruzaron machos *Stra8Cre* con hembras ADAM17<sup>lox/lox</sup>, obteniendo los ratones portadores y no del gen Cre, siendo los primero los ratones utilizados como wild type, mientras los segundos son los heterocigotos. Luego, se hizo una retrocruza entre las crías machos portadoras del gen Cre y hembras ADAM17<sup>lox/lox</sup> para obtener el ratón AD17KO-GC.

### *Inyecciones de los xenoestrógenos*

Después de tomar el peso promedio de los ratones, se inyectaron intraperitonealmente (ip) distintas dosis de cada xenoestrógeno (BFA, Sigma, o NF, Supelco-Sigma), los que fueron disueltos en etanol para obtener las soluciones stock. Para inyectar se diluyeron estas soluciones en aceite de oliva. Como vehículo se utilizó etanol disuelto en aceite de oliva. El volumen inyectado nunca superó los 20 µl. Después de esperar el tiempo establecido para cada experimento se procedió a sacrificar los ratones para la extracción de muestras.

### *Extracción de DNA*

Aproximadamente 0,5 cm fue cortado de cola de ratón. El pedazo de cola fue colocado en 600  $\mu$ l de un buffer de disgregación (50 mM Tris pH 8,0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS y 1% de proteinasa K de 10mg/ml disuelta en 20 mM de Tris pH7,4 y 1mM de CaCl) en un baño a 55°C hasta la disgregación. Luego se centrifugó 2 minutos a 10,000 rpm y se agregaron 450  $\mu$ l de isopropanol a temperatura ambiente. La mezcla fue agitada y luego el pellet formado se colocó en otro tubo. Se agregó 500  $\mu$ l de etanol 70% en agua. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar. Una vez seco el pellet se agregó 100  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.

### *Extracción de RNA y generación de cDNA*

El RNA fue extraído usando TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente,  $1 \times 10^6$  células fueron puestas en 1ml de Trizol y fueron sonicadas. Posteriormente, se adicionó 200  $\mu$ l de cloroformo y fueron centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. La fase acuosa fue extraída y traspasada a un nuevo tubo, luego se adicionó 1 ml de isopropanol y se incubó a -20°C por 30 minutos, enseguida la muestra se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol 70% en agua DEPC, la muestra fue centrifugada, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por 3 minutos. Luego se adicionó 20  $\mu$ l de agua DEPC y la muestra fue calentada a 65°C por 5 minutos. El RNA obtenido se almacenó a -80°C hasta su utilización como molde para la generación de cDNA. El RNA fue cuantificado y luego se determinó su integridad en un gel de agarosa al 1%. Para generar cDNA, se transformaron 2  $\mu$ g de RNA, usando *random primers* (Invitrogen, Carlsbad, CA) y *M-MLV Reverse Transcriptase* (Primega, USA).

### *PCR*

El DNA obtenido desde la cola de ratones o el cDNA obtenido desde las muestras fue amplificado por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) usando *PCR master mix* (Promega, USA) en 25µl de volumen final de reacción. Las alícuotas de producto de PCR fueron corridas en geles al 3% agarosa con SYBR Safe™ DNA gel stain (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) corridos a 80 V.

### *Partidores específicos y protocolo de ciclos*

#### *Alelo wild type Lox*

Sence 5'-TGGGGAAGCAAAGTTGTAGG-3'

Antisence 5'-TCTCTGGACCCCTTCTTCCT-3'

Ciclo 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; 72°C por 2 minutos

#### *Alelo Transgen Lox*

Sence 5'-TACTGCCGGGCCTCTTGCGGGG-3'

Antisence 5'-TACTGGTGGGGAGGGGGAGAGATTACGAAGGC-3'

Ciclo 95°C por 15 minutos; 43 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; 72°C por 15 minutos

*Alelo wild type Cre*

Sence 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'

Antisence 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'

Ciclo 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos,  
60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos

*Alelo Transgen Cre*

Sence 5'-GTGCAAGCTGAACAACAGGA-3'

Antisence 5'-AGGGACACAGCATTGGAGTC-3'

Ciclo 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos,  
60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos

*ADAM17*

Sence 5'-GTTGGTGAGCCTGACTCTA-3'

Antisence 5'-CCTCTTGTGGAGACTTGA-3'

Ciclo 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos,  
60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto; 72°C por 2  
minutos

*Neuregulina β1*

Sence 5'-ATCCACGACTGGGACCAG-3'

Antisence 5'-AAGCTTCTGCCGCTGTTTC-3'

Ciclo 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos,  
60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto; 72°C por 2  
minutos

## GAPDH

Sence 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Antisence 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

Ciclo 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos

### *Histología de testículos*

Los testículos de ratón fueron fijados en solución de Bouin (15 partes de solución acuosa de ácido pícrico, 5 partes de formaldehído y una parte de ácido acético glacial). Los tejidos se fijaron por lo menos durante una noche a temperatura ambiente. Luego, fueron incluidos en parafina, se obtuvieron cortes de 5 µm y se montaron en portaobjetos silanizados. Los cortes fueron des-parafinados través de una batería de alcohol-xilol.

### *Aislación de espermatocitos*

Se siguió el protocolo descrito por Bustamante et al. (Bustamante-Marin et al., 2012). Brevemente, al menos tres testículos por muestra de ratones de 21 días fueron decapsulados y colocados en medio KHB (120 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,4 mM KCl, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Hepes) suplementado con 5 mM Lactato, 0,4 µg/ml DNAsa, 0,5 mg/ml Colagenasa I. Las muestras fueron invertidas hasta obtener la digestión del tejido. Luego, los túbulos seminífero fueron lavados 3 veces con medio KHB suplementado con 5 mM Lactato. Después de agregó 0,4 µg/ml de DNAsa y se disgregaron los túbulos seminíferos con una aguja de 21G. Las células aisladas fueron filtradas usando mallas de

nylon de con perforaciones de 140 y 70  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las muestras fueron centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos. Posteriormente las muestras fueron resuspendidas en medio KHB suplementado con 5 mM Lactato, 0,4  $\mu\text{g/ml}$  DNAsa, 0,7 % peso/volumen de BSA y 5 % de Percoll. Los espermatoцитos fueron purificados mediante una gradiente de Percoll luego de ser centrifugados a 3.000 rpm durante 30 minutos. Los espermatoцитos corresponden a las células encontradas en la interfase de 25 % y 30 %. Los espermatoцитos recuperados se lavan 3 veces con medio KHB suplementado con lactato 5 mM.

#### *Extracción de espermatozoides*

Después de sacrificar los machos por dislocación cervical, se extrajeron los cauda epididimales y conductos deferentes, trasladándolos a una cápsula Petri con 300  $\mu\text{l}$  de medio Whittingham modificado (99,2 mM NaCl, 2,69 mM KCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,314 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,79 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de Hepes, 21,5 mM lactato de sodio, 0,5 mM piruvato de sodio, 5,5 mM glucosa, 0,063 mg/ml penicilina sódica y 0,050 mg/ml estreptomina) (Fraser and Drury, 1975) por 15 min a 37°C, permitiendo la salida de los espermatozoides por *swim out*.

#### *Inmunofluorescencia*

Los cortes de tejido fueron des-parafinados a través de una batería de xilol y luego hidratados a través de una batería de alcohol y luego lavados con PBS. O los espermatozoides aislados fueron fijados en 4% de paraformaldehído en PBS (pH 7,4) por 15 minutos a 4°C y luego permeabilizados con metanol frío por 5 minutos. Luego los espermatozoides fueron colocados en un portaobjetos silanizado. El siguiente protocolo es el mismo para los cortes de tejido o los

espermatozoides. Para prevenir uniones inespecíficas, las muestras fueron tratadas con 3% de BSA en TBS con 0,1% de Tween-20 por 1 hora. El anticuerpo primario contra ADAM17 o contra caspasa-3 activa, diluido 1:250 en 3% de BSA en TBS con 0,1% de Tween-20, fue colocado en la muestra a una concentración de 1mg/ml e incubado a 4°C toda la noche en una cámara húmeda. Luego, los portas fueron lavados tres veces por 10 minutos en TBS con 0,1% de Tween-20. Luego el anticuerpo anti-rabbit FITC diluido 1:250 en 3% de BSA en TBS con 0,1% de Tween-20 fue aplicado a las muestras y fue incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Después, los portas fueron lavados tres veces por 10 minutos en TBS con 0,1% de Tween-20. Finalmente, las muestras fueron montadas con Fluoromont® (Sigma, St Louis, MO) y observadas en el microscopio Nikon Eclipse E200 (Tokyo, Japón) y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital CMOS 519 (Microscope America, Inc, Atlanta, USA).

#### *Extracción de proteínas y Western Blot*

La extracción de proteínas fue realizada por homogenización de testículos aislados decapsulados, o espermatozoides aislados o células aisladas en un buffer que contiene 1 M NaCl, 2 mM Tris-HCl pH 7,4 más un cóctel de inhibidores (Sigma St Louis, MO, USA) que contiene 2 mM AEBSF [4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonylfluoride hydrochloride], 0,3 mM aprotinina, 130 mM clorhidrato de bestatina, 14 mM ME-64, 1 mM EDTA, y 1 mM leupeptina. Las muestras fueron sonicadas y centrifugadas por 10 minutos a 1.200 rpm a 4°C. Las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) bajo condiciones denaturantes y reductoras, y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 350 mA por 2 horas. La membrana fue bloqueada con un buffer que contiene con 3% peso/volumen de leche descremada, 0,1 Tween-20 en TBS, pH 7,4, y luego incubado toda la noche a 4°C con

uno de los siguientes anticuerpos: anti-ADAM17 (0,3 mg/ml), anti-SCP-3 (0,3 mg/ml), anti-PARP-1/2 (0,2 mg/ml) y anti- $\beta$ -actina (0,3 mg/ml) como control de carga. Después las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-0,1% Tween-20 por 10 min y luego se incubó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (KPL, Gaithersburg, MD) diluido 1:3.000 en la solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas de proteínas fueron reveladas usando un *kit* de electroquimioluminiscencia (PerkinElmer Inc., Waltham, USA).

#### *Radioinmuno ensayo*

Los ratones fueron anestesiados con ketamina:xilazina (1 mg/kg: 750 mg/kg) intraperitoneal. La sangre fue extraída con una jeringa tuberculina directo del corazón. Luego el ratón fue sacrificado por dislocación cervical. Para obtener el suero la sangre se dejó decantar toda la noche a 4°C. Luego, la muestra se centrifugó y se obtuvo el suero. Las muestras de suero fueron entregadas a la unidad de RIA del departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile para determinar los niveles de estradiol y testosterona.

#### *Tinción con ácido peryódico de Schiff*

Los cortes de tejido fueron des-parafinados a través de una batería de xilol y luego hidratados a través de una batería de alcohol y luego lavados con PBS. Posteriormente las muestras fueron tratadas por 10 min con una solución de 0,5% peso/volumen de ácido peryódico. Luego, se lavaron con agua destilada y se incubaron con el reactivo de Schiff (0,5 % peso/volumen de fucsina básica, 10% de HCl 1N, 0,5 % peso/volumen de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 0,05%

peso volumen de carbono vegetal activado) por 30 minutos a temperatura ambiente apartado de la luz. Después, las muestras se lavaron dos veces por 5 minutos con el buffer de lavado (5% de HCl 1N y 0,5% peso/volumen de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ). Finalmente se lavaron con agua destilada, se tiñeron los núcleos con hematoxilina, se des-hidrataron y fueron montados en Entellan® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Las fotografías fueron tomadas en el mediante el equipo Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology (NDP), cuyo servicio lo entrega el departamento de Microscopia Virtual del Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

#### *Capacitación de espermatozoides e inducción de Reacción del Acrosoma*

Una vez que los espermatozoides fueron extraídos desde el cauda del epidídimo, se separaron 4 alícuotas de espermatozoides, 1) Tiempo cero para evaluar la RA espontánea, 2) MC (Medio Capacitante: 99,2 mM NaCl, 2,69 mM KCl, 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,314 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,79 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 21,5 mM lactato de sodio, 0,5 mM piruvato de sodio, 5,5 mM glucosa, 0,063 mg/ml penicilina sódica, 0,050 mg/ml estreptomicina y 3% BSA) para evaluar la RA espontánea después de 120 minutos de capacitación, 3) Vehículo (Etanol) para evaluar la RA después de 120 minutos de capacitación en donde en los últimos 30 minutos se les agrega el vehículo, y 4) P4 para evaluar la RA después de 120 minutos de capacitación en donde en los últimos 30 minutos se agrega P4 40  $\mu\text{M}$  para inducir la RA. Para la capacitación *in vitro*, los espermatozoides se resuspendieron en MC e incubaron en gotas bajo aceite mineral, a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ , durante 90 minutos. Pasado este tiempo se les agregó MC, vehículo o P4 por 30 min.

### *Tinción con Azul de Coomassie para determinar RA*

Cada muestra se fijó en 4% de paraformaldehído en PBS (pH 7,4) durante 15 minutos a 4°C. Luego las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm y se lavaron 3 veces con acetato de amonio 0,1 M (pH 9,0). Las muestras se extendieron en portaobjetos silanizados y se dejaron secar a 37°C. Posteriormente se realizaron lavados sucesivos de 5 minutos con metanol y agua destilada y se tiñeron con azul de Coomassie-G250 por 2 minutos. Finalmente las muestras se montaron en Entellan® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Las muestras se miraron en el microscopio Olumpus CX31 (Tokyo, Japón) y se cuantificaron al menos 200 espermatozoides por muestra.

### *Análisis de TUNEL*

La fragmentación de DNA fue evaluado por el análisis de TUNEL en cortes des-parafinado de testículo de ratón. El *kit* DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, obtenido desde Promega (Madison, WI, USA) fue usado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron observadas en el microscopio Nikon Eclipse E200 (Tokyo, Japón) y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital CMOS 519 (Microscope America, Inc, Atlanta, USA). Las células TUNEL positivas, visualizadas como células verdes, fueron cuantificadas en cada sección de tejido contando el número de células TUNEL positivas por cada sección de túbulo seminífero en áreas tomadas al azar. Se contaron en total al menos 100 túbulos seminíferos de tres ratones diferentes.

### *Cultivos celulares*

Las líneas celulares GC-1 (proveniente de espermatogonias y espermatoцитos de ratón), TM4 (proveniente de células de Sertoli de ratón) y LnCap (proveniente de cáncer de próstata humana) fueron cultivadas en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS y 10% de antibiótico antimicótico (100X), pH 7,2 a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo de cada botella fue cambiado cada 2 días. Para cada experimento se plaquearon  $2 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos, lo que equivale a una confluencia de un 80%. Por otro lado los fibroblastos embrionarios de ratón fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y 10% de antibiótico antimicótico (100X), pH 7,2 a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo de cada placa fue cambiado cada 2 días. Para cada experimento se plaquearon  $0,5 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos, lo que equivale a una confluencia de un 80%.

### *Transfección de células*

Las líneas celulares GC-1, TM4 y LnCap y los fibroblastos embrionarios de ratón fueron transfectadas con los plásmido (AP)-NRG  $\beta$ 1, (AP)-TNF $\alpha$ , (AP)-TGF $\alpha$ , (AP)-HB-EGF o (AP)-BTC gentilmente donados por el Dr. Carl Blobel (Hospital for Special Surgery, New York, USA), el shRNA contra el mensajero de la ADAM17 de ratón gentilmente donado por el Dr. Yan (Tongji Medical College, Wuhan, China) (Yan et al., 2009) o el shRNA contra el mensajero de la ADAM17 humano obtenido desde Qiagen (Venlo, Holanda). Para esto se sembraron las células con un 80% de confluencia, luego de 12 horas, las células se privaron de medio completo por 1 hora. Posterior a eso, las células fueron cultivadas 6 horas con el complejo DNA-LipofectAMINE 2000, y finalmente las células se mantuvieron por 24 horas

en DMEM-F12 o RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y 10% de antibiótico antimicótico (100X).

*Generación de Línea Celular que Expresa Establemente (AP)-NRG  $\beta$ 1*

Se realizaron cultivos celulares de células LnCap transfectadas con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 en placas de 6, a una confluencia de un 80%, por dos semanas con diferentes concentraciones del antibiótico zeocina: 50, 100, 200, 400 mg/ml. Luego de este tiempo, se tomaron alícuotas de 1 ml de células y se mezclaron con 0,6  $\mu$ l de azul tripan. Finalmente, se contaron las células en una cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular. La concentración del antibiótico zeocina a la cual se observó un menor porcentaje de viabilidad se utilizó para seleccionar las células que hayan incorporado el plasmidio. Luego de saber cuál es la concentración de antibiótico zeocina mínima necesaria para generar una mayor cantidad de muerte celular. Las células transfectadas con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 fueron cultivadas en placas de 6, con una confluencia de un 80%, por 2 semanas con el antibiótico zeocina. Luego, fueron traspasadas a botellas de cultivo para que las células seleccionadas proliferen. Siempre cultivadas con medio completo suplementado con zeocina.

*Estimulación de células con BFA y NF y ensayo de actividad de fosfatasa alcalina*

Cultivos celulares (con un 90% de confluencia) de las células que hayan sido transfectadas con los diferentes plasmidios fueron expuestas a diferentes concentraciones de BFA y NF a distintos tiempos. Posteriormente, el medio de las células tratadas y de los controles se incubó por 1 hora con el *kit* p-NPP (4:1), el cual es un sustrato colorimétrico y soluble de la fosfatasa

alcalina. La actividad de fosfatasa alcalina es detectada por un espectrofotómetro a 450 nm (ELx800TM, BioTek, USA).

#### *Ensayo de microarreglo de proteínas fosfoquinasas*

Para este ensayo se utilizó un *kit* de microarreglo obtenido desde R&DSystem (Mineapolis,USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, 600 µg de proteínas obtenidas desde las células LnCap estimuladas por 15 min con Vehículo (etanol), 100 µM BFA o 50 µM NF fueron incubadas por toda la noche a 4°C en la membrana incorporada en el *kit* previamente bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con el buffer de lavado incorporado en el *kit*. Después las membranas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos incluidos en el *kit* y se posteriormente se lavaron 3 veces por 10 minutos con el buffer de lavado. Luego la membrana se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo estreptavidina acoplado a peróxido de rábano y posteriormente se lavó 3 veces por 10 minutos con el buffer de lavado. Luego las membranas fueron incubadas con el *reagente Mix* incorporado en el *kit* y fueron expuestas en un film.

#### *Análisis del ciclo celular por citometría de flujo*

Las células TM4 o LnCap fueron tripsinizadas y lavadas en PBS, luego fueron centrifugadas por 5 minutos a 1.200 rpm y el pellet fue resuspendido en 200 µl de PBS. Luego las células fueron fijadas con etanol 70% al menos 1 hora a 4 °C y posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 1.200 rpm. Después el pellet fue lavado 3 veces con PBS tras centrifugaciones de 5 minutos a 1.200 rpm. Luego el pellet fue resuspendido en 250 µl de buffer de ciclo (0,1%

Triton-100, 20  $\mu\text{g/ml}$  RNAsa y 2  $\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio en PBS). Las muestras fueron analizadas dentro de los 10 minutos después de añadir el buffer de ciclo en un citómetro de flujo (FAScanto) y 10.000 eventos fueron adquiridos por cada muestra. Todos los datos fueron analizados con el programa FCS express V4.0 (DeNovo Software, Los Ángeles).

#### *Ensayo de apoptosis por exposición de Anexina V*

Las células TM4 o LnCap fueron tripsinizadas y lavadas con PBS frío tres veces. Para este ensayo se utilizó el *kit* Annexin V: FITC apoptosis detection kit II. Brevemente, las muestras fueron centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos y el pellet se diluyó en 100  $\mu\text{l}$  de PBS, luego se agregó 5  $\mu\text{l}$  de Anexina V acoplado a FITC y 5  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después se añadió 400  $\mu\text{l}$  de *binding buffer IX* incluido en el *kit*. Las muestras fueron analizadas dentro de los 10 minutos después de añadir el *binding buffer IX* en un citómetro de flujo (FAScanto) y 10.000 eventos fueron adquiridos por cada muestra. Todos los datos fueron analizados con el programa FCS express V4.0 (De Novo Software, Los Ángeles).

#### *Análisis estadístico*

Nuestros experimentos fueron realizados con un mínimo de 3 experimentos independientes. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Graphpad 5, utilizando los análisis de ANOVA o t-student como test primario.

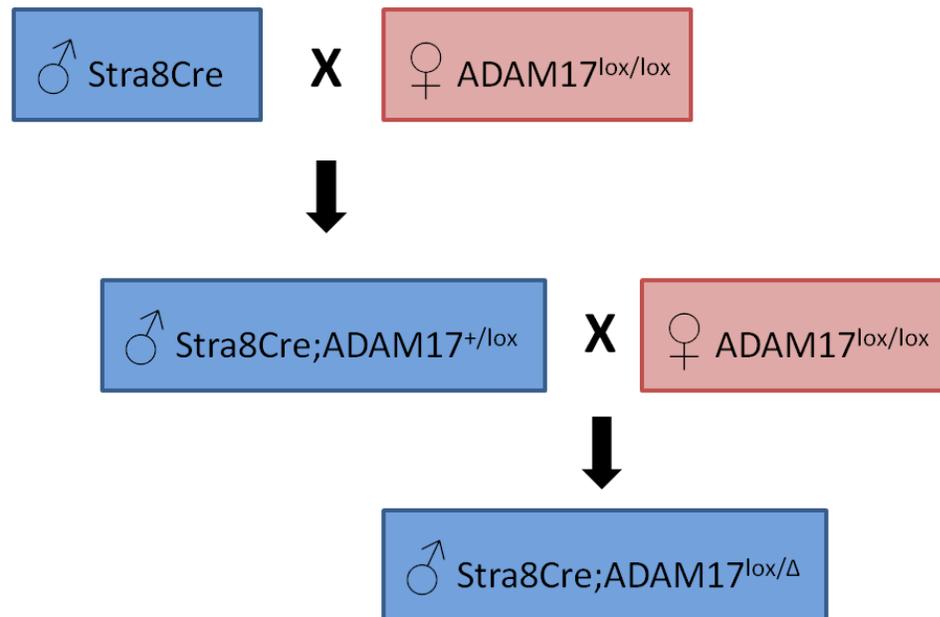
## RESULTADOS

### **1. Determinar la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas meióticas y post-meióticas sobre la apoptosis de estas células *in vivo*.**

Para la generación del ratón *knock out* de ADAM17 en células germinales masculinas (AD17KO-GC) fue necesario generar cruces de ratones Adam17tm1.2Bbl, es decir ratones cuyo gen flanqueado por LoxP es *adam17*, y ratones Tg(Stra8-cre)1Reb/J, donde la expresión de la enzima Cre está bajo el promotor del gen *stra8* (stimulated by retinoic acid 8). Desde ahora estos ratones serán llamados ADAM17<sup>lox/lox</sup> y Stra8Cre, respectivamente. Los ratones ADAM17<sup>lox/lox</sup> involucran las cepas 129P2/OlaHsd y C57BL/6, mientras que los ratones Stra8Cre involucran la cepa FVB.

Stra8 es un gen específico de la línea germinal masculina y femenina. En machos es transcrito en espermatogonias en etapa temprana en los testículos postnatales la cual persiste en las células germinales premeióticas durante la adultez (Oulad-Abdelghani et al., 1996). El grupo de Sadate-Ngatchou creadores el ratón Stra8Cre describieron que cre se expresa sólo en machos y comienza en el día postnatal 3 en las espermatogonias en etapa temprana y se detecta en los espermatoцитos en estadio de preleptoteno (Sadate-Ngatchou et al., 2008). Es por esta razón, que el ratón creado en esta tesis pierde a la ADAM17 sólo en las células meióticas y post-meióticas.

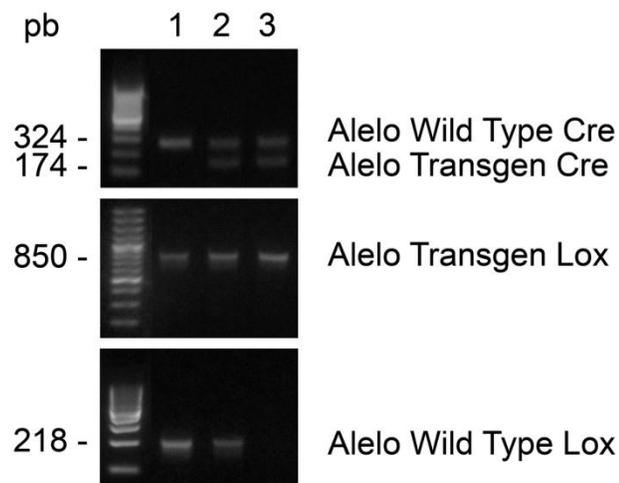
Para el desarrollo de esta tesis se trabajó con ratones *wild type*,  $Stra8Cre;ADAM17^{+/lox}$  o heterocigotos y  $Stra8Cre;ADAM17^{lox/\Delta}$  o AD17KO-GC. Cruzando machos  $Stra8Cre$  con hembras  $ADAM17^{lox/lox}$  se generaron los ratones  $Stra8Cre;ADAM17^{+/lox}$ . Cuando se cruzaron ratones machos  $Stra8Cre;ADAM17^{+/lox}$  con hembras  $ADAM17^{lox/lox}$  el ratón resultante es  $Stra8Cre;ADAM17^{lox/\Delta}$ , los cuales contienen un alelo flox y un alelo flox recombinante en sus células meióticas y post-meióticas (Fig. 1).



**Figura 1: Generación de ratones *wild type*,  $Stra8Cre;ADAM17^{+/lox}$  y  $Stra8Cre;ADAM17^{lox/\Delta}$ .**

Machos  $Stra8Cre$  fueron cruzados con hembras  $ADAM17^{lox/lox}$  para generar ratones  $Stra8Cre;ADAM17^{+/lox}$ . Machos  $Stra8Cre;ADAM17^{+/lox}$  fueron cruzados con hembras  $ADAM17^{lox/lox}$  para generar ratones  $Stra8Cre;ADAM17^{lox/\Delta}$ .

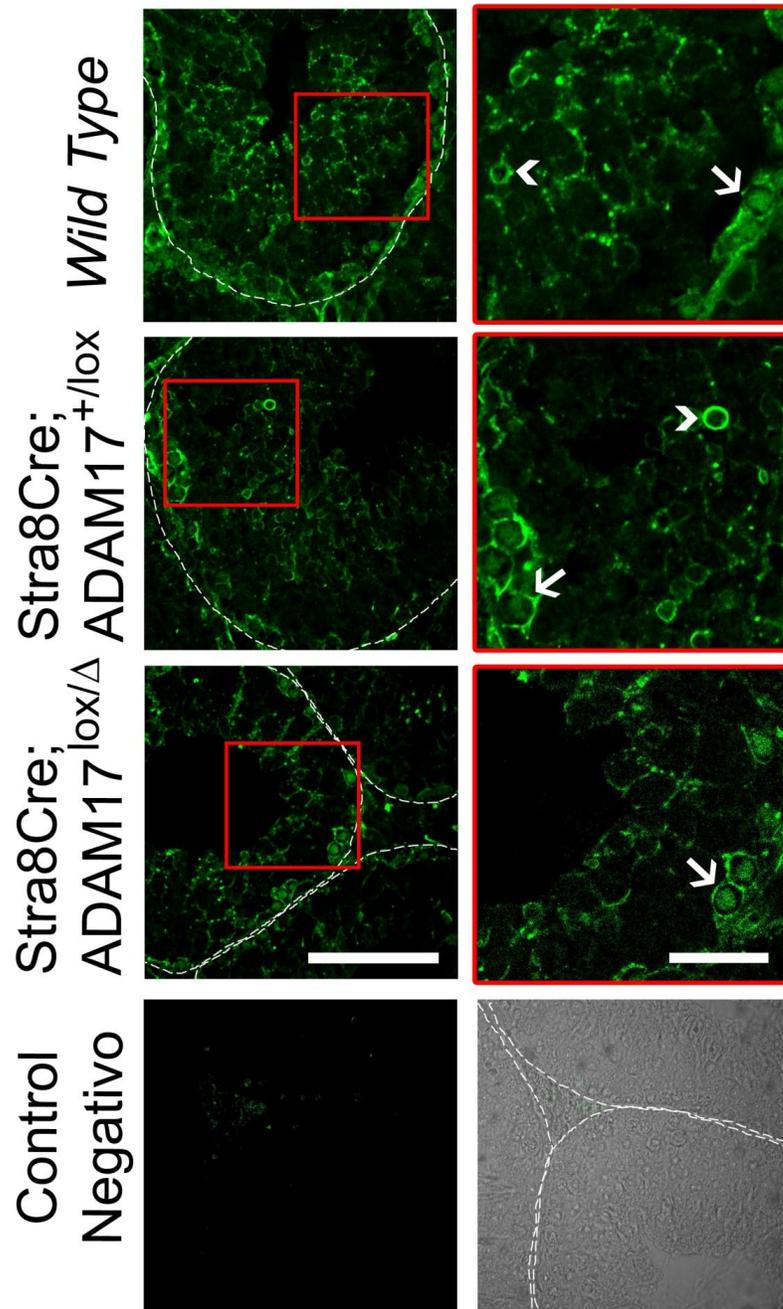
Los alelos *wild type*, flox y cre fueron genotificados usando PCR. Para el alelo flox se obtiene una única banda de aproximadamente 850 pb, mientras que su *wild type* corresponde a una única banda de aproximadamente 218 pb. Por otro lado, para el alelo Cre se obtiene una banda de 174 pb y para su control de 324 pb (Fig. 2). En el ratón *wild type* se observa la presencia de las bandas transgen y *wild type* de para el alelo lox, mientras que sólo se observa la presencia de la banda *wild type* y no la transgen para el alelo Cre. Por otro lado, en ratón Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>, también la presencia de las bandas transgen y *wild type* de para el alelo lox, sin embargo se observa la presencia de las bandas *wild type* y transgen del alelo cre. Por último, el ratón Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> presenta sólo la banda transgen del alelo lox y las bandas *wild type* y transgen del alelo cre.



**Figura 2: Genotipo de ratones.**

PCR convencional para genotipo de ratones *wild type* (1), Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> (2) y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> (3). En el ratón *wild type* (1) se observa la presencia de las bandas transgen y *wild type* de para el alelo lox, mientras que sólo se observa la presencia de la banda *wild type* y no la transgen para el alelo Cre. En cambio, en ratón Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>, si se observa la presencia del transgen del alelo cre (2). Por último, el ratón Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> presenta las bandas transgen de los alelos cre y lox, pero no se observa la presencia de la banda *wild type* del alelo lox.

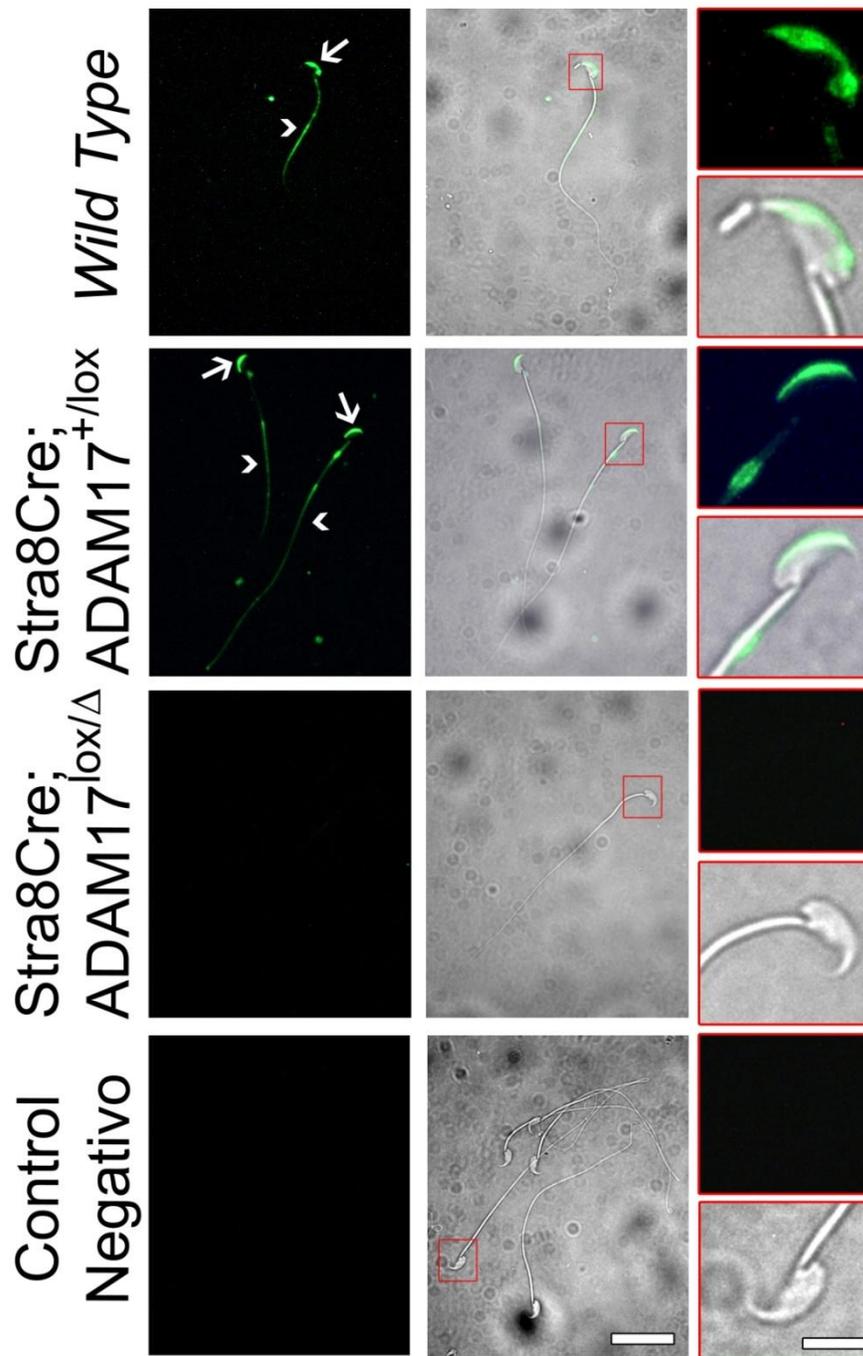
Para evaluar si efectivamente no existía presencia de la proteína ADAM17 en células meióticas y post-meióticas se realizó inmunofluorescencia y *western blot*. En cortes transversales de testículo de ratón *wild type* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* de 60 días de edad, la inmunoreacción en contra de la ADAM17 fue en todo el túbulo seminífero, observándose principalmente en células pre-meióticas (flecha) y en células post-meióticas (cabeza de flecha). Por otro lado, en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*, no se observó la inmunoreacción en las células post-meióticas confirmando así que son ratones *knock out* condicionales para la ADAM17 en las células post-meióticas (Fig. 3). En estos ratones se pudo observar inmunoreacción en células de la base de los túbulos seminíferos, que corresponden a espermatogonias, y en la superficie de la célula de Sertoli que se proyecta hacia el lumen del tubulo seminifero.



**Figura 3: Localización de la ADAM17 en testículo de ratón.**

Localización por inmunofluorescencia de la ADAM17 (verde) en cortes transversales de testículo de ratón *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>. En los tres tipos de ratones se observa tinción en el contorno de células pre-meióticas (flecha), mientras que las células post-meióticas se encuentran sólo marcadas en los ratones *wild type* y Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> (cabeza de flecha). Imagen de la derecha representa una magnificación del cuadrado rojo en imagen izquierda. Barra imagen izquierda 70μm. Barra imagen derecha 30μm.

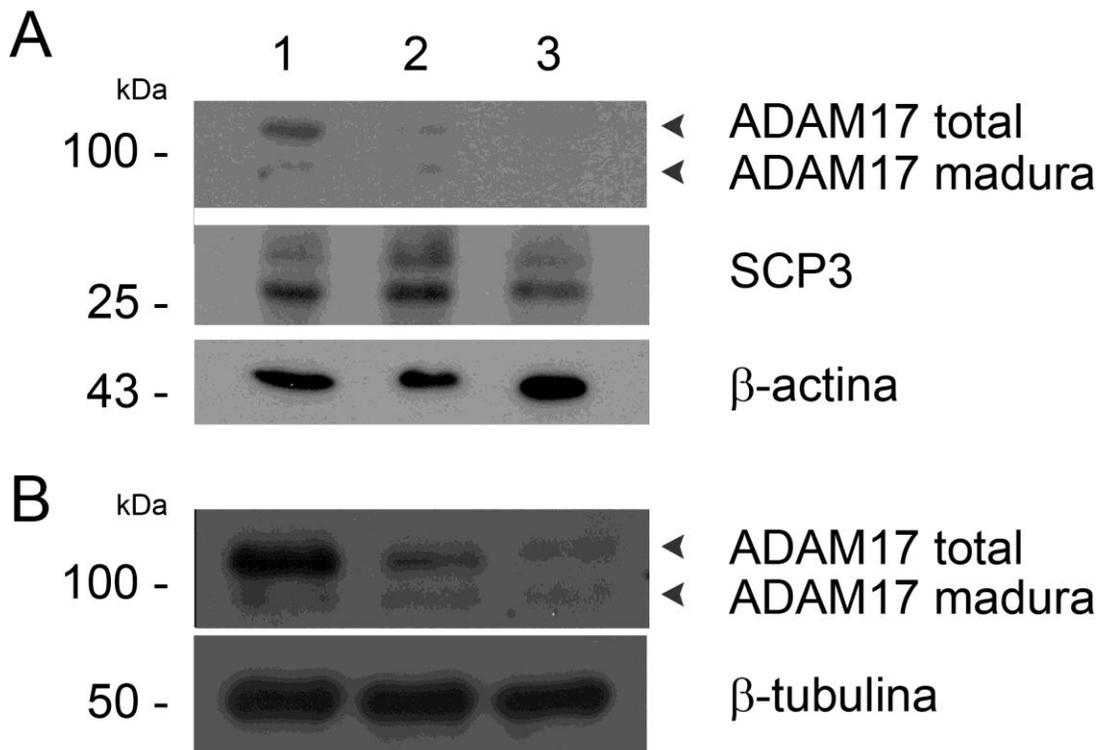
Además, se realizó inmunofluorescencia contra la ADAM17 en espermatozoides obtenidos desde el epidídimo en los tres tipos de ratones de 120 días de edad, observándose una inmunorreacción tanto en la cabeza (flecha) como en la cola (cabeza de flecha) de los espermatozoide de los ratones *wild type* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>*, sin embargo, esto no se observa en el espermatozoide obtenido de ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*, confirmando nuevamente que son ratones *knock out* condicionales para ADAM17 en las células post-meióticas, incluyendo el producto final de la espermatogénesis, el espermatozoide (Fig. 4).



**Figura 4: Localización de la ADAM17 en espermatozoide de ratón.**

Localización por inmunofluorescencia de la ADAM17 (verde) en espermatozoides obtenido desde el epidídimo de ratón *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* de 120 días de edad. En los ratones *wild type* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* se observa tinción en la cabeza (flecha) y cola (cabeza de flecha) del espermatozoide. No se observa tinción para ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*. Imagen de la derecha representa una magnificación del cuadrado rojo en imagen izquierda. Barra imagen izquierda 20 $\mu$ m. Barra imagen derecha 4 $\mu$ m.

Para corroborar el resultado obtenido por las inmunofluorescencias, se detectaron los niveles proteicos de la ADAM17 en espermatoцитos aislados (células en meiosis) y en espermatozoides de ratones de 21 y 120 días de edad, respectivamente, mediante *western blot*. En los espermatoцитos (Fig. 5A) y espermatozoides (Fig.5B) de ratones *wild type* se observó una banda definida de la ADAM17 pero los niveles proteicos disminuyeron notablemente en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y prácticamente se observó una total ausencia de la banda en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*. Como control de carga se utilizó una proteína general como  $\beta$ -actina y SCP3, que está presente en el complejo sinaptonémico y es un control positivo para células meioticas.

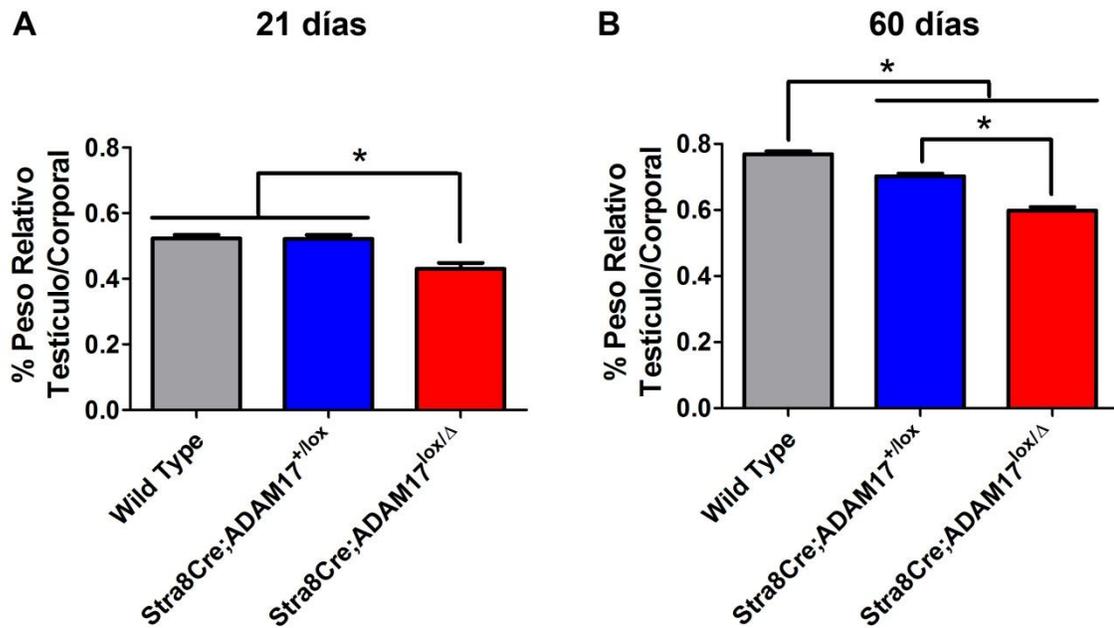


**Figura 5: Niveles proteicos de la ADAM17 en espermatocitos y espermatozoides aislados de ratón.**

(A) Niveles proteicos de la ADAM17 total (con prodominio) y madura (sin prodominio) (panel de arriba), SCP3 como marcador de espermatocitos (panel del centro) y β-actina como control de carga (panel de abajo) en espermatocitos aislados de ratones *wild type* (1), *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* (2) y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* (3) de 21 días de edad mediante gradiente de percoll. Se observa la presencia de la ADAM17 en ratones *wild type*, la cual disminuye en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y desaparece en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*. SCP3 mantiene los niveles en los tres tipos de ratones. (B) Niveles proteicos de la ADAM17 total (con prodominio) y madura (sin prodominio) (panel de arriba), y β-tubulina como control de carga (panel de abajo) en espermatozoides aislados desde el epidídimo de ratones *wild type* (1), *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* (2) y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* (3) de 120 días de edad. Se observa la presencia de la ADAM17 en ratones *wild type*, la cual disminuye en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y desaparece en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*.

Estos resultados indican que se logró generar un ratón *knock out* de la ADAM17 específico para tejido y tipo celular.

Para determinar si la ADAM17 participa en el desarrollo de la espermatogénesis del ratón, como primera aproximación se calculó el porcentaje del peso testicular en comparación al peso corporal a los 21 y 60 días de edad en los ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*. Los porcentajes para los ratones de 21 días fueron de  $0,52\pm 0,01\%$ ,  $0,52\pm 0,01\%$  y  $0,43\pm 0,02\%$  para los ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*, respectivamente (Fig. 6A). Mientras que para los ratones de 60 días de edad fueron  $0,77\pm 0,01\%$ ,  $0,70\pm 0,01\%$  y  $0,60\pm 0,01\%$ , respectivamente (Fig. 6B), lo que significa una disminución en un 17,3% y un 22,1% en el peso testicular de los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* tanto a los 21 días de edad como en los adultos, respectivamente. A diferencia de los heterocigotos (que sólo pierden un alelo de la *adam17*) donde se observa una disminución del 9,1% del peso testicular sólo en los ratones adultos. Esto podría sugerir que la ADAM17 participa en el desarrollo de la espermatogénesis, donde el efecto de su ausencia total o parcial se observa principalmente en la adultez.

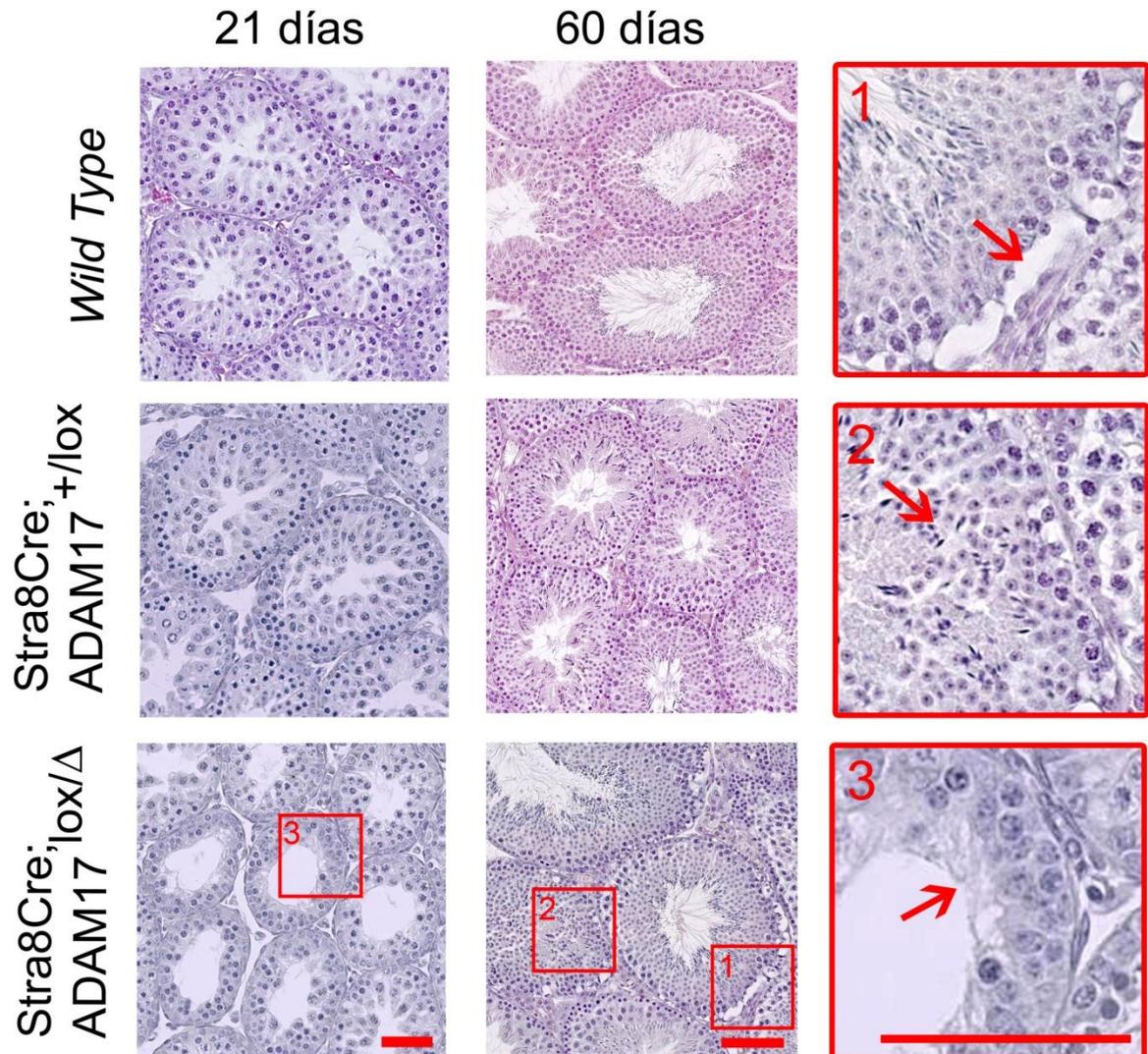


**Figura 6: Disminución del porcentaje del peso relativo testicular en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> a los 21 y 60 días.**

Porcentaje relativo del peso de ambos testículos respecto al peso corporal en los ratones *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> de 21 (A) y 60 (B) días de edad. Se observa una disminución del peso testicular en los ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> a los 21 días de edad, mientras que en los ratones de 60 días de edad se observa una disminución tanto en los ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup> como en los Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \*p<0,05. N=13 y 28 para los ratones de 21 y 60 días, respectivamente. Cada valor corresponde al promedio± SEM.

Para determinar si la ausencia de la ADAM17 en células germinales masculinas provoca alteraciones histológicas en la espermatogénesis se analizaron cortes transversales de testículos teñidos con hematoxilina-eosina de los ratones *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> a los 21 y 60 días de edad (Fig. 7). Se observó vacuolización en la base del epitelio seminífero (posiblemente hay una falla en la formación de la barrera hematotesticular) (Fig. 7(1)), alteraciones en la localización de los tipos de células germinales

(Fig. 7(2)) y disminución de la altura del epitelio seminífero (Fig. 7(3)), lo que no se observó en los ratones *wild type* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>*.



**Figura 7: La ausencia de la ADAM17 en células germinales post-meióticas masculinas provoca alteraciones histológicas en el epitelio del túbulo seminífero.**

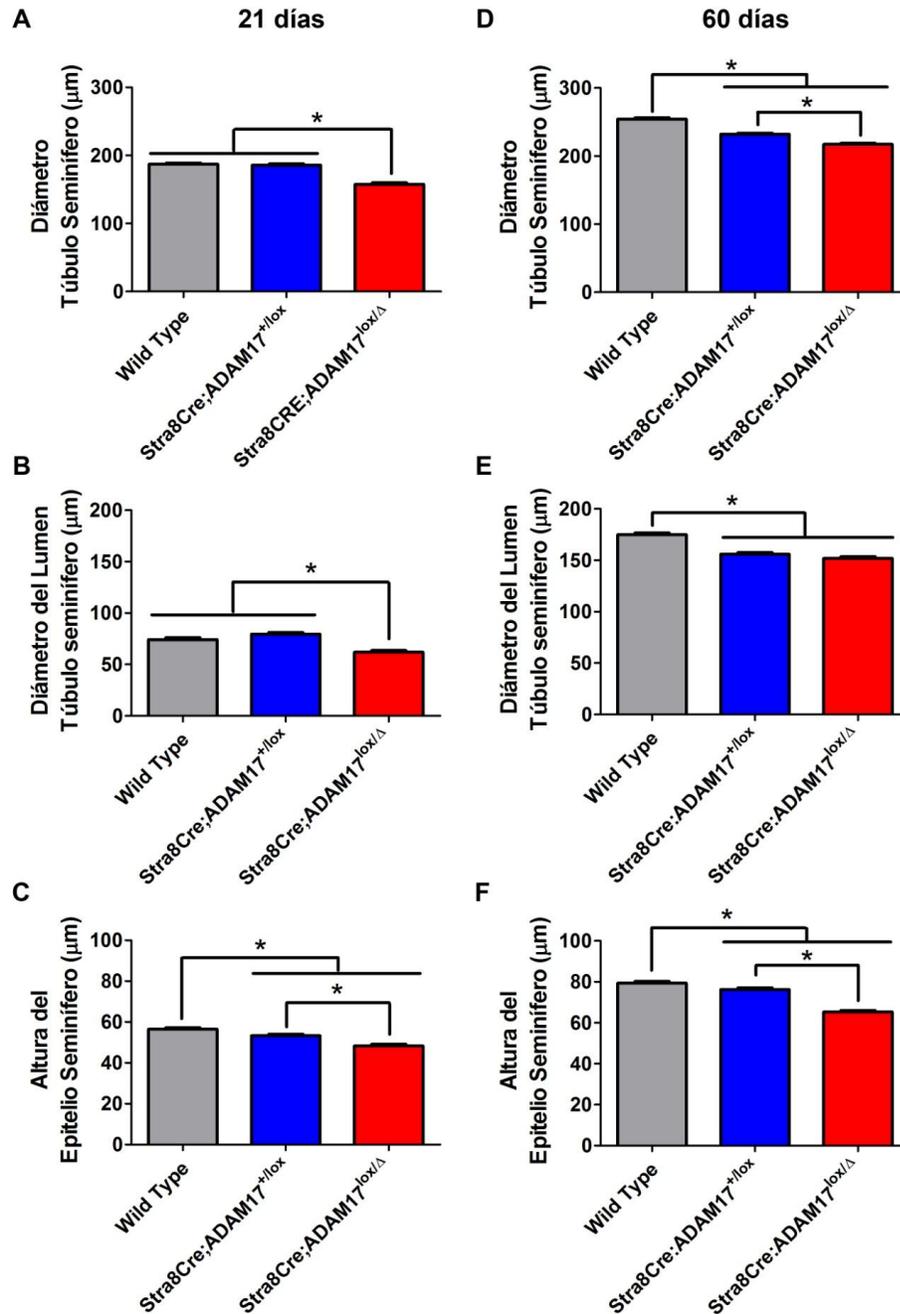
Cortes transversales de testículos de ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* de 21 y 60 días de edad. Se observa alteraciones en el epitelio del túbulo seminífero en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* de ambas edades. Observándose con más detalle, los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* presentan vacuolización en la base del epitelio seminífero (1), alteración de localización de células germinales (2) y disminución de la altura del epitelio seminífero (3). Barra 50  $\mu\text{m}$ .

En vista a los cambios histológicos observados en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* tanto a los 21 días de edad como en los adultos, se entró en más detalle y se cuantificaron parámetros histológicos del testículo, como el diámetro del túbulo seminífero, la altura del epitelio seminífero y el diámetro del lumen del túbulo seminífero, tanto en ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* como *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* (Fig. 8).

El diámetro del túbulo seminífero fue similar entre los ratones *wild type* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* ( $187,1 \pm 1,83$  y  $185,6 \pm 1,96$   $\mu\text{m}$ , respectivamente), mientras que en los *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* este parámetro fue de  $157,7 \pm 2,17$   $\mu\text{m}$ , lo que representó una disminución en un 15,7% (Fig. 8A). La altura del epitelio seminífero fue de  $56,45 \pm 0,78$   $\mu\text{m}$ , en ratones *wild type*, mientras que resultó ser significativamente menor en los *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* ( $53,25 \pm 0,76$   $\mu\text{m}$ ) y en los *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* ( $48,28 \pm 0,82$   $\mu\text{m}$ ), con una reducción en un 14,5% (Fig. 8B). El diámetro del lumen del túbulo seminífero fue de  $74,18 \pm 1,87$ ,  $79,44 \pm 1,72$  y  $61,90 \pm 1,68$   $\mu\text{m}$ , respectivamente en los ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*, respectivamente (Fig. 8C). La disminución en estos parámetros se correlaciona con el peso testicular observado en estos ratones (Fig. 6A).

Por otro lado, en los ratones adultos de 60 días, el diámetro del túbulo seminífero fue de  $254,4 \pm 1,64$ ,  $232,1 \pm 1,56$  y  $217,2 \pm 1,6$   $\mu\text{m}$  en ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*, respectivamente (Fig. 8D). La altura del epitelio seminífero fue de  $79,40 \pm 0,78$ ,  $76,24 \pm 0,77$  y  $65,27 \pm 0,80$   $\mu\text{m}$ , respectivamente (Fig. 8E). Mientras que el diámetro del lumen del túbulo seminífero fue de  $175,0 \pm 1,52$ ,  $155,9 \pm 1,69$  y  $151,9 \pm 1,68$   $\mu\text{m}$ , respectivamente (Fig. 8F). Por lo tanto, tanto los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* como los

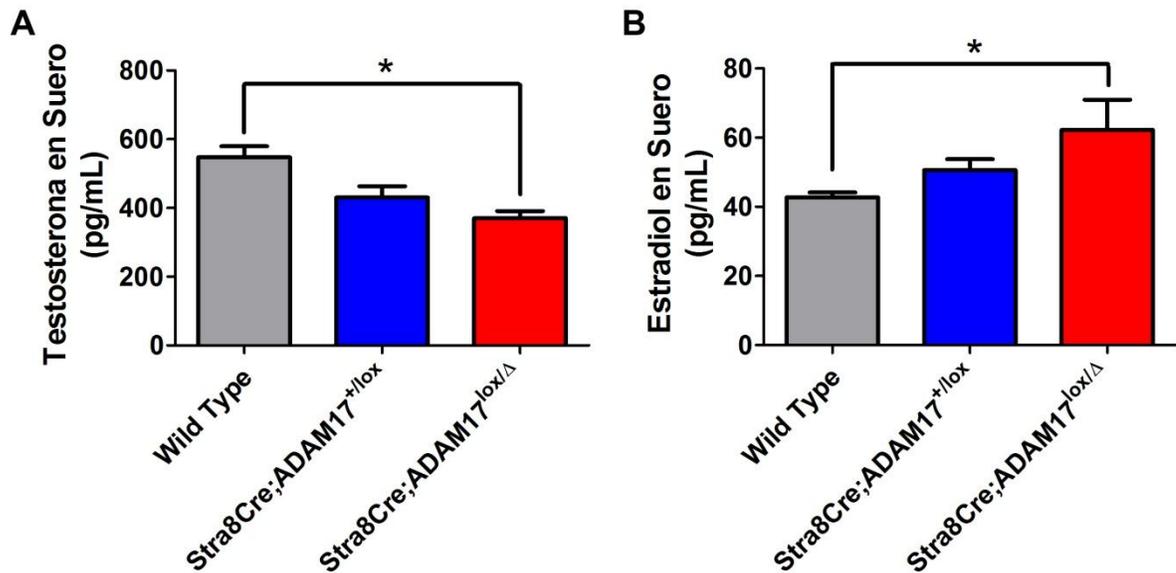
Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> presentaron una disminución de un 8,8% y 14,6% en el diámetro del túbulo seminífero, de un 4,0% y 17,79% en la altura del epitelio y de un 10,9% y 13,25% en el diámetro del lumen del túbulo seminífero, respectivamente a los 60 días de edad respecto a los ratones *wild type*, lo que también se correlaciona con la disminución del peso testicular a esa edad (Fig. 6B). Además, esto sugiere que con el aumento de la edad se observa un mayor efecto negativo en el desarrollo de la espermatogénesis cuando no se encuentra presente la ADAM17 en las células meióticas y post-meióticas.



**Figura 8: La ausencia de la ADAM17 en células germinales meióticas y post-meióticas masculinas provoca alteraciones en los parámetros histológicos del testículo.**

Diámetro del túbulo seminífero (A y D), altura del epitelio del túbulo seminífero (B y E) y diámetro del lumen del túbulo seminífero (C y F) en ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* de 21 y 60 días de edad. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \* $p < 0,05$ .  $N=3$ . Se cuantificaron al menos 100 túbulos por cada N. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM.

Por otro lado, para determinar si la disminución en el peso testicular se pudiese deber a algún desbalance endocrino, se cuantificó mediante Radio Inmuno Ensayo (RIA), los niveles plasmáticos de testosterona y estradiol en los ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* a los 21 días de edad. Los niveles de testosterona fueron de 547,3±32,01, 430,2±32,63 y 370,1±20,68 (pg/ml), respectivamente, observándose una disminución significativa de un 32.4% en los niveles de esta hormona en los machos *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* comparado con los *wild type* (Fig. 9A). Por otro lado, los niveles plasmático de estradiol en suero tuvieron una tendencia opuesta a los niveles de testosterona, donde los niveles séricos del estradiol fueron 42,77±1,37, 50,66±3,11 y 62,25±8,69 (pg/ml) para los ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*, observándose un incremento significativo de un 45,5% los niveles de estradiol en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* comparado con los ratones *wild type* (Fig. 9B). Por lo tanto, la ausencia de ambos alelos de la *adam17* en células germinales masculinas (ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*) provoca una disminución de testosterona y un aumento de estradiol.



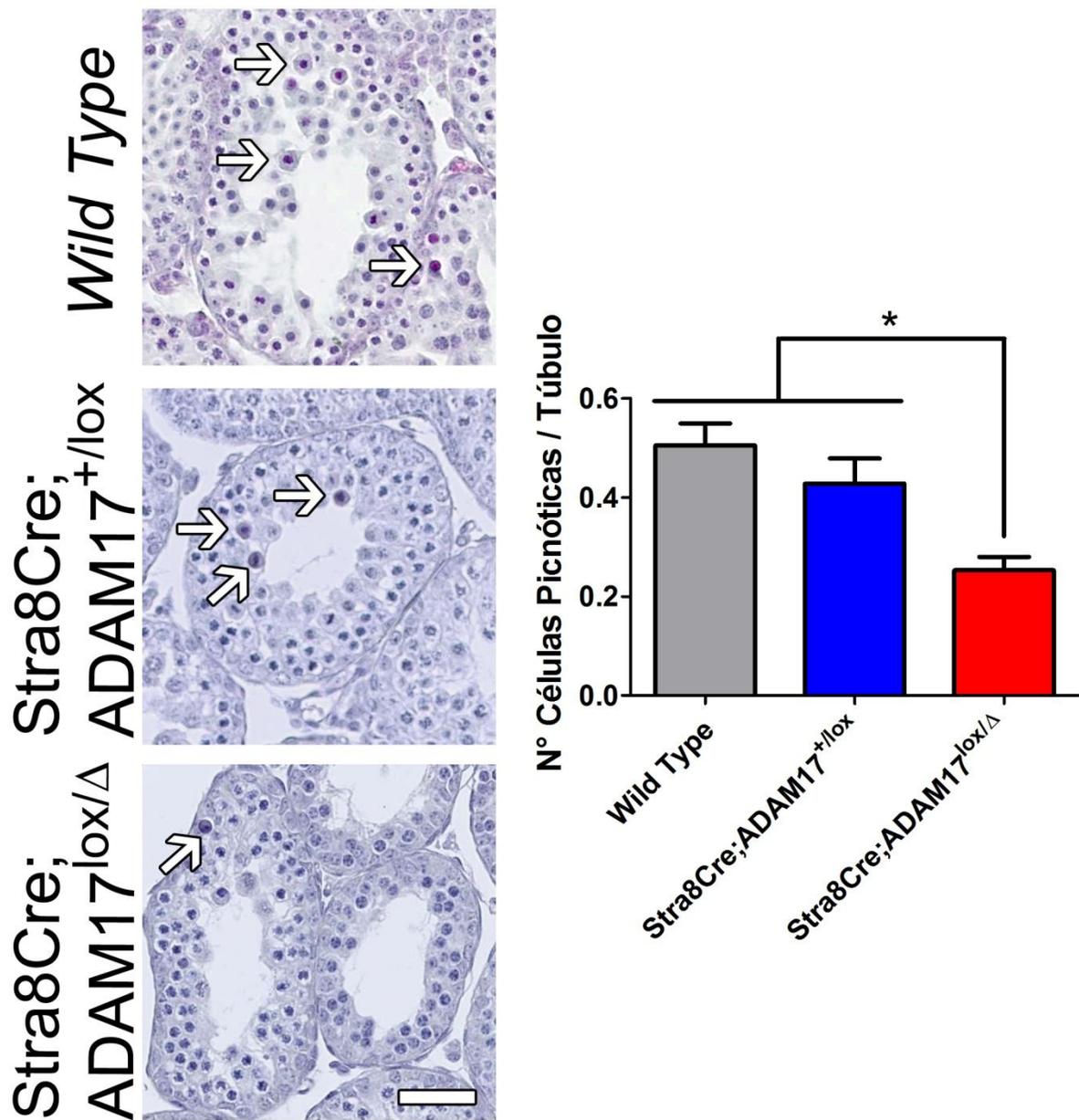
**Figura 9: La ausencia de la ADAM17 en células germinales masculinas meióticas y post-meióticas altera los niveles en suero de la hormona testosterona y estradiol.**

Niveles en suero de la hormona testosterona (A) y estradiol (B) de ratones *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> de 21 días de edad. Se observa una disminución en los niveles plasmáticos de testosterona y un aumento de estradiol en los ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \*p<0,05. N=5 y 6 para ratones *wild type*, N=17 y 10 para ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y N=3 y 4 para los ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> para las mediciones de testosterona y estradiol, respectivamente. Cada valor corresponde al promedio±SEM.

Para determinar si la ADAM17 participa en la apoptosis fisiológica de las células germinales, se utilizaron ratones macho *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> de 21 días de edad y se evaluó apoptosis mediante cuantificación de células picnóticas y células caspasa-3 activa positivas por túbulo seminífero.

Por tinción de ácido peryódico de Schiffy hematoxilina (PAS-He), se determinó el índice de apoptosis, que es el número de células apoptóticas por túbulo seminífero. Las células

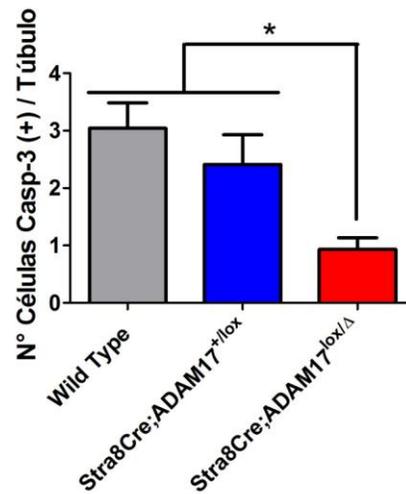
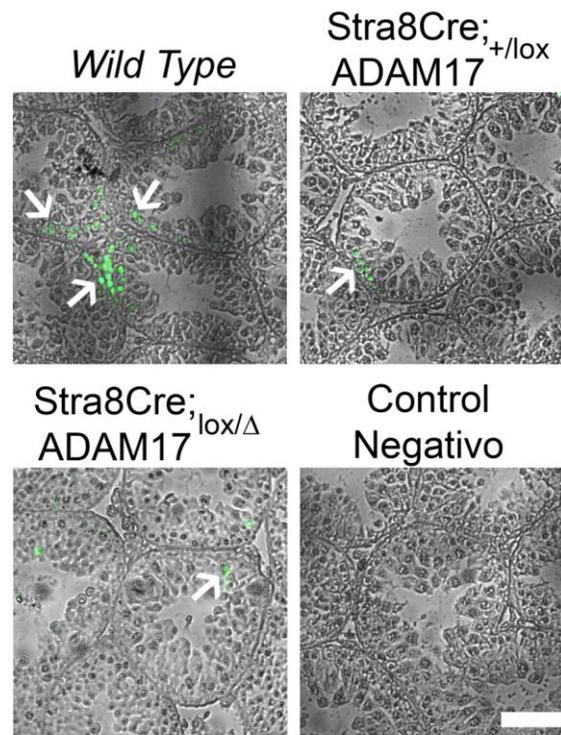
apoptóticas, son aquellas que se identifican por su forma esférica y apariencia picnótica (concentrada y oscura, flechas en Fig.10), y que se ha descrito previamente que son células positivas para TUNEL, es decir, poseen DNA fragmentado, uno de los últimos eventos de la apoptosis (Moreno et al., 2006). El índice apoptótico fue de  $0,50\pm 0,04$ ,  $0,43\pm 0,05$  en ratones *wild type* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>*, respectivamente, el cual disminuyó significativamente en un 50% ( $0,25\pm 0,03$ ) en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* (Fig. 10).



**Figura 10: Disminución del índice apoptótico en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>.**

Índice apoptótico de células germinales determinado por el número de células picnóticas por túbulo seminífero mediante tinción PAS-He. Se observa una reducción significativa del número de células picnóticas en condiciones fisiológicas en los ratones de 21 días Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>, respecto a los ratones *wild type* y Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \* $p < 0,05$ . N=3, donde se cuantificaron al menos 100 túbulos por N. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM. Barra 50  $\mu$ m.

Algo similar se observó con la cuantificación del número de células caspasa-3 activa positiva por túbulo seminífero. Los ratones *wild type* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* tuvieron  $3,04 \pm 0,44$  y  $2,41 \pm 0,52$  células caspasa-3 activa positiva por túbulo seminífero (flecha), lo que se redujo significativamente en un 69,4% en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* observándose valores de  $0,93 \pm 0,21$  células caspasa-3 activa positiva por túbulo seminífero (Fig. 11).



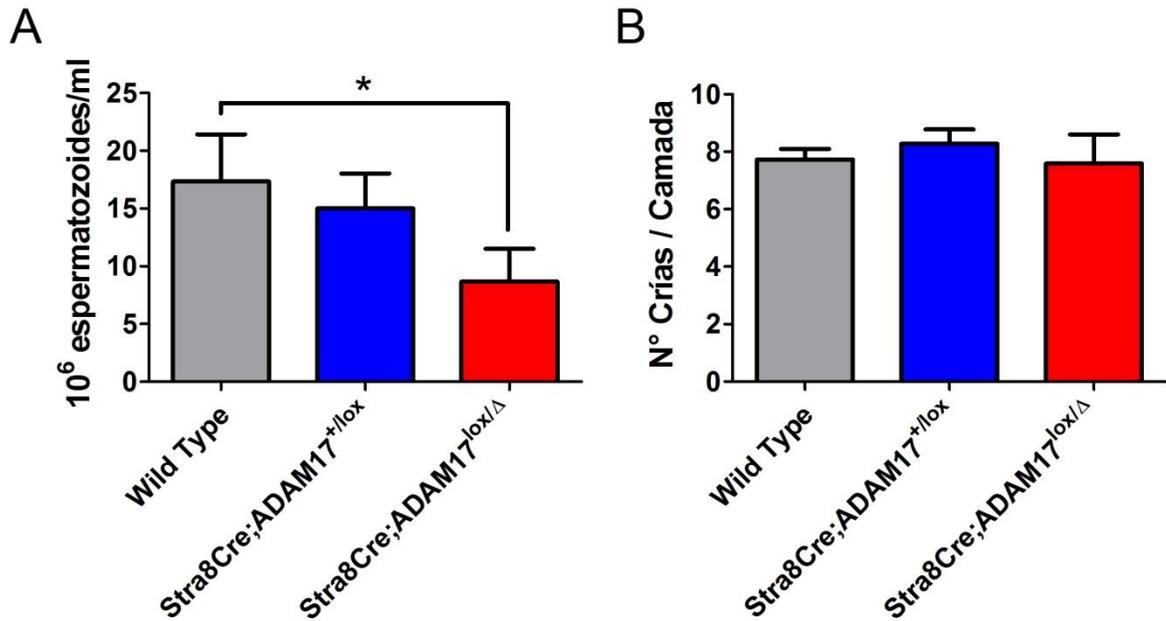
**Figura 11: Disminución de células caspasa-3 activa positiva en ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*.**

Número de células caspasa-3 positiva por túbulo seminífero determinado por inmunohistoquímica. Se observa una reducción significativa el número de células caspasa-3 activa positiva en condiciones fisiológicas en los ratones de 21 días de edad *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*, respecto a los ratones *wild type* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>*. Las imágenes de fluorescencia y contraste de fase fueron superpuestas para una mejor visualización de las células apoptóticas. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \* $p < 0,05$ .  $N = 3$ , donde se cuantificaron al menos 100 túbulos por N. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM. Barra 50  $\mu$ m.

Por lo tanto, la ausencia de la ADAM17 en las células germinales meióticas y post-meióticas es suficiente para prevenir la muerte fisiológica de células germinales en ratones de 21 días de edad.

Debido a los daños histológicos, desregulación de los niveles hormonales y prevención de apoptosis de células germinales observadas en el ratón *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* se determinó si los daños de la espermatogénesis observados en estos ratones se ven reflejados en el producto final de la espermatogénesis, que son los espermatozoides. Para ello se determinó: (1) la concentración de espermatozoides, como un parámetro de funcionalidad de la espermatogénesis (Bonde et al., 1998; Sharpe, 2012); y (2) el porcentaje de la reacción acrosómica (RA) espontánea e inducida, como un parámetro de funcionalidad del espermatozoide (Aitken, 2006; Oehninger et al., 2014) en espermatozoides obtenidos desde el epidídimo de ratón *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* de 120 días de edad.

La concentración de espermatozoides observada en los ratones *wild type* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>* fue de  $17,33 \pm 4,10 \times 10^6$  y  $15,00 \pm 3,03 \times 10^6$  espermatozoides por ml, la cual se redujo en un 50% observándose valores de  $8,67 \pm 2,85 \times 10^6$  espermatozoides por ml en los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* (Fig. 12A). A pesar de ello, se observó que los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* son fértiles, debido a que el promedio de crías por camada fue similar en los tres tipos de ratones (Fig. 12B).



**Figura 12: Disminución de concentración de espermatozoides en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>.**

(A) Concentración de espermatozoides por ml obtenido desde el epidídimo de ratón de 120 días de edad, y (B) número de crías por camada en los ratones *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>. Se observa una reducción significativa de la concentración de espermatozoides en los ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> comparado con los *wild type*, sin embargo no se observan cambios en el número de crías por camada. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \*p<0,05. N=3 para la concentración de espermatozoides. Para el número de crías por camada N=8 para los ratones *wild type*, N=5 para los ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y N=3 para los ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>. Cada valor corresponde al promedio± SEM.

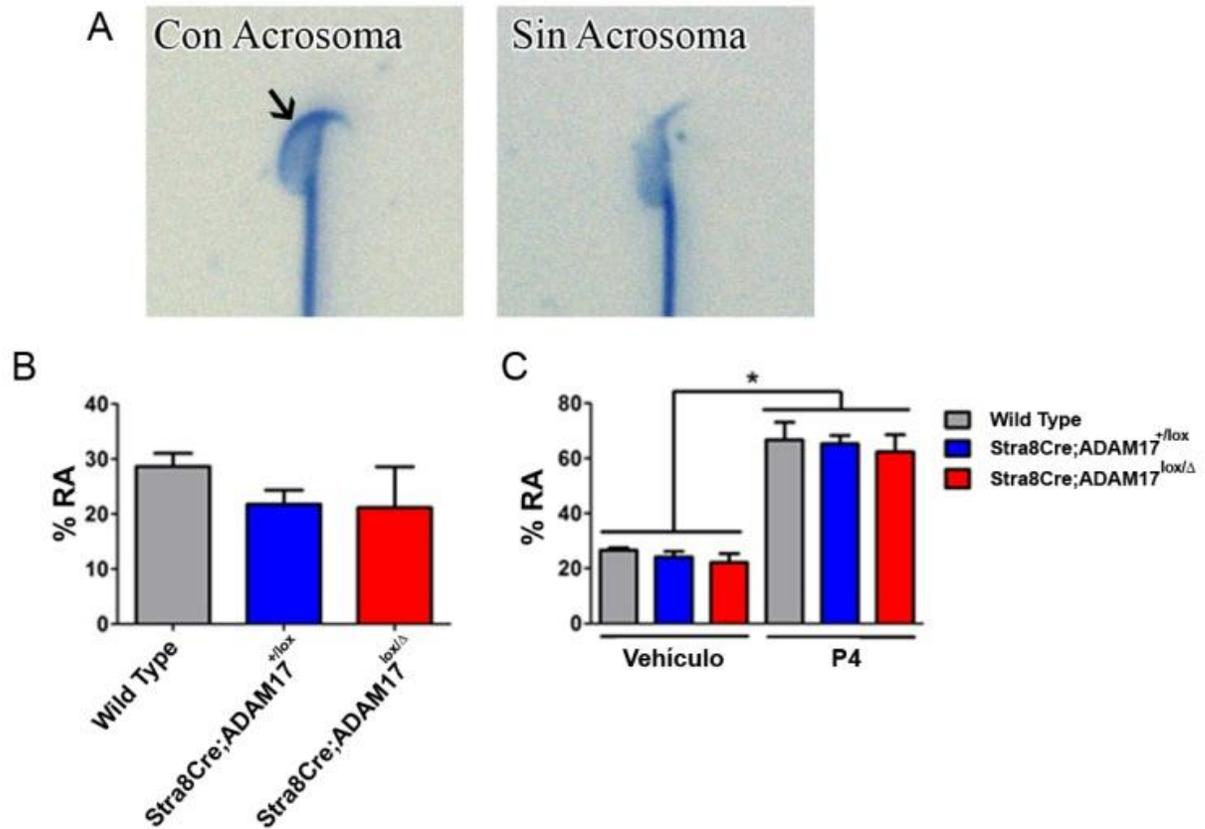
A partir de este resultado, se quiso encontrar una posible explicación de porqué la fertilidad de los ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>, es similar a las otras dos líneas a pesar de encontrar daños histológicos, desregulación de los niveles hormonales, prevención de apoptosis de células germinales y disminución de la concentración de espermatozoides. Es por ello que se evaluó uno de los principales parámetros que determinan la capacidad de los espermatozoides de fecundar a los ovocitos, que es la reacción acrosómica (RA).

La RA es un evento exocitótico, secuencial y dependiente de calcio, que puede ser inducido por agentes fisiológicos como progesterona (P4), glicoproteínas de la zona pelúcida del ovocito, entre otros. La capacidad del espermatozoide de experimentar la RA en respuesta a un agonista, determina su competencia para fecundar al ovocito (Kirkman-Brown et al., 2002; Jin et al., 2011). Por otro lado, la RA espontánea refleja el estado acrosomal y ocurre debido a la pérdida de la membrana acrosomal durante la muerte celular (Fig. 13A), tal como se ha observado cuando se reproducen *in vitro* los eventos relacionados con la capacitación del espermatozoide (Rufas et al., 1998; Marti et al., 2000). Es por ello que es necesario evaluar la RA espontánea para determinar la integridad del acrosoma en un estado basal (sin inductores) del espermatozoide.

No se observaron cambios en el porcentaje de la RA espontánea de los espermatozoides *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* determinado por tinción de azul de coomassie, cuyos porcentajes fueron de  $28,67 \pm 2,33$  %,  $21,75 \pm 2,60$  % y  $21,17 \pm 7,42$  %, respectivamente (Fig. 13B).

La RA inducida refleja la capacidad del espermatozoide de responder a inductores fisiológicos, como la progesterona, que se encuentra en el tracto genital femenino, ya que durante la ovulación esta hormona es sintetizada activamente por las células de la granulosa que conforman el cúmulo oóforo (Baldi et al., 1991; Kobori et al., 2000; Arienti et al., 2010; Hirohashi et al., 2015).

La RA de los espermatozoides *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> inducida por 40 μM P4 mostró un aumento de un 150% respecto al vehículo en los tres tipos de ratones. Sin embargo no hay variación entre ellos en condiciones vehículo o inducida, debido a que los valores observados cuando los espermatozoides son tratados con vehículo son de 26,67±0,88 %, 24,25±1,89 % y 22,17±3,25 % para los ratones *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>, respectivamente, mientras que los porcentajes de RA inducida fueron de 66,75±6,44 %, 65,33±3,02 % y 62,40±6,20 % para los ratones *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>, respectivamente (Fig. 13C).



**Figura 13: Reacción del acrosoma espontánea e inducida en ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/loxΔ</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*.**

(A) Imagen de espermatozoide teñido con azul de Coomassie. Se observa un espermatozoide con el acrosoma intacto (flecha) y otro con ausencia de esta vesícula. (B) Cuantificación de la RA espontánea y (C) RA inducida con 40  $\mu$ M P4 en espermatozoides obtenidos desde el epidídimo de ratones *wild type*, *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* de 120 días de edad determinado por tinción de azul de coomassie. No se observa diferencia en la RA espontánea entre los tres tipos de ratones. Se observa diferencia en la RA inducida con 40  $\mu$ M P4 comparado con el vehículo, sin embargo no hay diferencia entre los tres tipos de ratones. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \* $p < 0,05$ . N=3. Se contaron al menos 200 espermatozoides por N. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM.

Por lo tanto, en vista a los resultados obtenidos al evaluar la función del espermatozoide, explicaría porque los ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* son fértiles. Además, esto indicaría que la ADAM17 no se encuentra involucrada en el proceso de RA del espermatozoide.

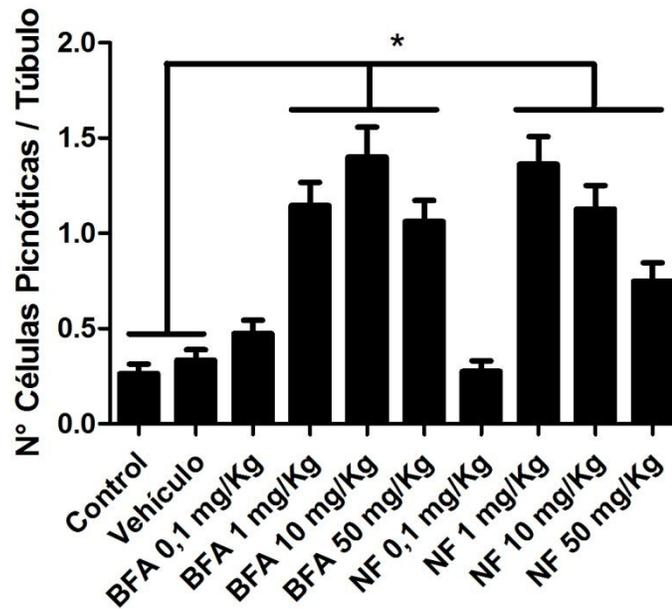
**2. Evaluar la participación de la ADAM17 de las células germinales masculinas meióticas y post-meióticas sobre la apoptosis de estas células inducida por los xenoestrógenos BFA y NF *in vivo*.**

Para evaluar la participación de la ADAM17 de las células germinales meióticas y postmeióticas sobre la apoptosis inducida por los xenoestrógenos BFA y NF de las células germinales, se utilizaron ratones macho *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+/*lox*</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/ $\Delta$</sup>  de 21 días de edad, y la muerte celular se evaluó mediante conteo de células picnóticas, células caspasa-3 activa y TUNEL positivas por túbulo seminífero.

Dado que los estudios previos han sido realizados en rata (Urriola-Munoz et al., 2014a), se realizó una curva de dosis-respuesta para BFA y NF, respectivamente. Para esto, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con BFA o NF diluido en aceite de oliva (en un volumen final de 20  $\mu$ l), y luego de 24 horas se determinó el índice de apoptosis.

El índice apoptótico del control y el vehículo (2  $\mu$ l de etanol más 18  $\mu$ l de aceite de oliva) fue de  $0,26\pm 0,05$  y  $0,33\pm 0,06$ , respectivamente, mientras que los tratamientos con las dosis de 0,1, 1, 10 y 50 mg/Kg de BFA mostraron un aumento significativo de este parámetro,  $0,47\pm 0,07$ ,  $1,15\pm 0,12$ ,  $1,40\pm 0,16$  y  $1,06\pm 0,11$  células picnóticas por túbulo seminífero, respectivamente. En cuanto al tratamiento con NF, a las dosis de 0,1, 1, 10 y 50 mg/Kg de NF, se observaron  $0,28\pm 0,05$ ,  $1,36\pm 0,14$ ,  $1,13\pm 0,12$  y  $0,75\pm 0,10$  células picnóticas por túbulo seminífero, respectivamente. Lo que representó un aumento significativo en relación al

vehículo (Figura 14). Por lo tanto, se observó un aumento de 3,8; 4,7 y 3,5 veces con las dosis de 1, 10 y 50 mg/Kg de BFA y de 4,5; 3,8 y 2,5 veces con las dosis de 1, 10 y 50 mg/Kg de NF en comparación con el control y el vehículo (Fig. 14). Estos resultados indican que una aplicación aguda y de baja concentración tanto de BFA como de NF (1 mg/kg) inducen muerte de células germinales en testículo de ratones, es por ello, que se escogió la dosis de 1 mg/Kg de BFA o NF para los futuros experimentos. Cabe destacar que ambas dosis a utilizar son más bajas que las dosis en donde no se observan efectos adversos (NOAEL, No Observed Adverse Effect Level, por sus siglas en inglés).

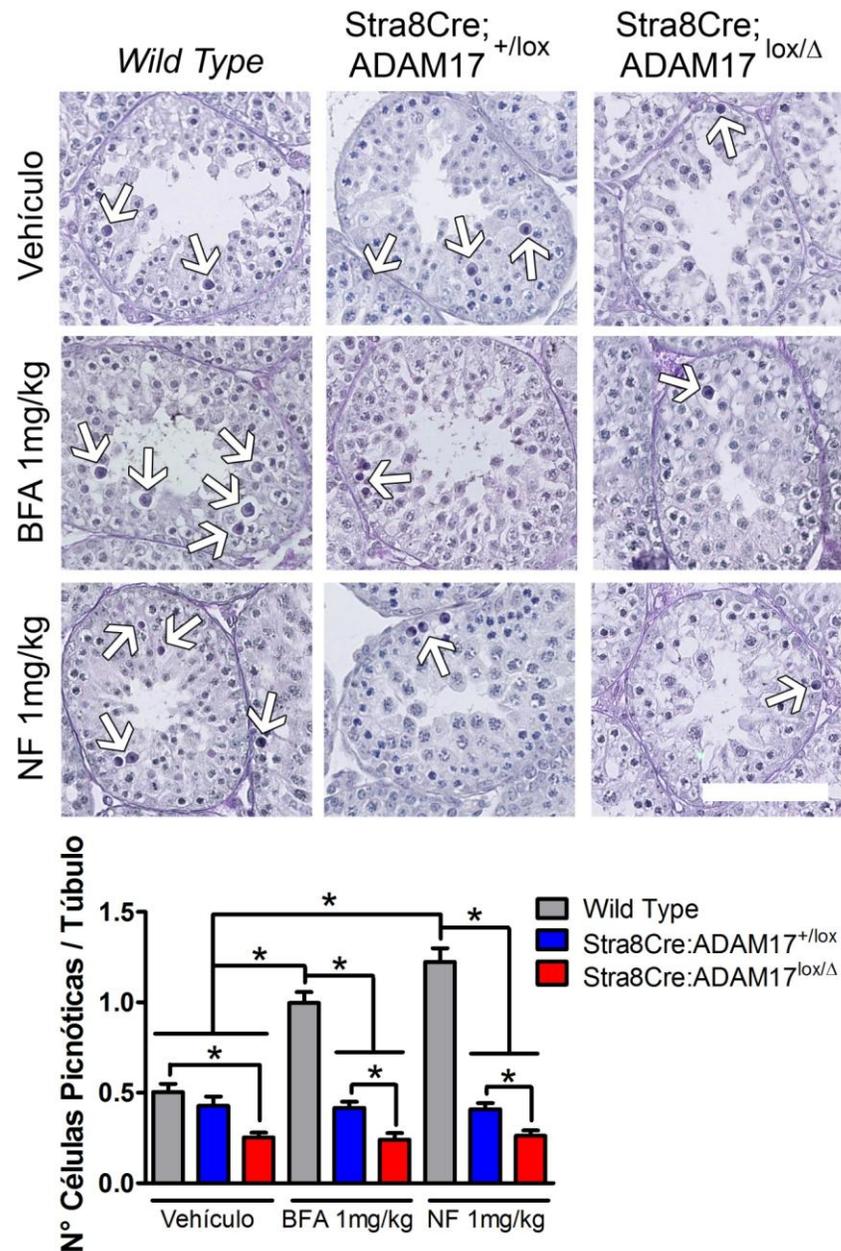


**Figura 14: BFA y NF inducen muerte celular en testículo de ratón.**

A las 24 horas post-administración de una sola inyección intraperitonealmente de BFA o NF (0,1 - 1 - 10 ó 50 mg/Kg) se observa un incremento significativo de células muertas en testículos de ratón *wild type* de 21 días de edad. Las dosis de 1, 10 y 50 mg/Kg de BFA o NF inducen un aumento significativo del número de células picnóticas por túbulo seminífero, determinadas mediante tinción de PAS-He. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \* $p < 0,05$  con respecto al control y vehículo (etanol).  $N=3$ , donde se cuantificaron al menos 100 túbulos por N. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM.

Luego, ratones *wild type*, Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup> y Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> de 21 días de edad fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única de 1 mg/Kg de BFA o NF por 24 horas. Posteriormente, se determinó mediante histología, por tinción de PAS-He, el índice de apoptosis en los túbulos seminíferos (Fig. 15), se cuantificaron el número de células caspasa-3 activa por túbulo seminífero determinada por inmunofluorescencia (Fig. 16) y además se cuantificaron el número de células TUNEL positivas por túbulo seminífero (Fig. 17).

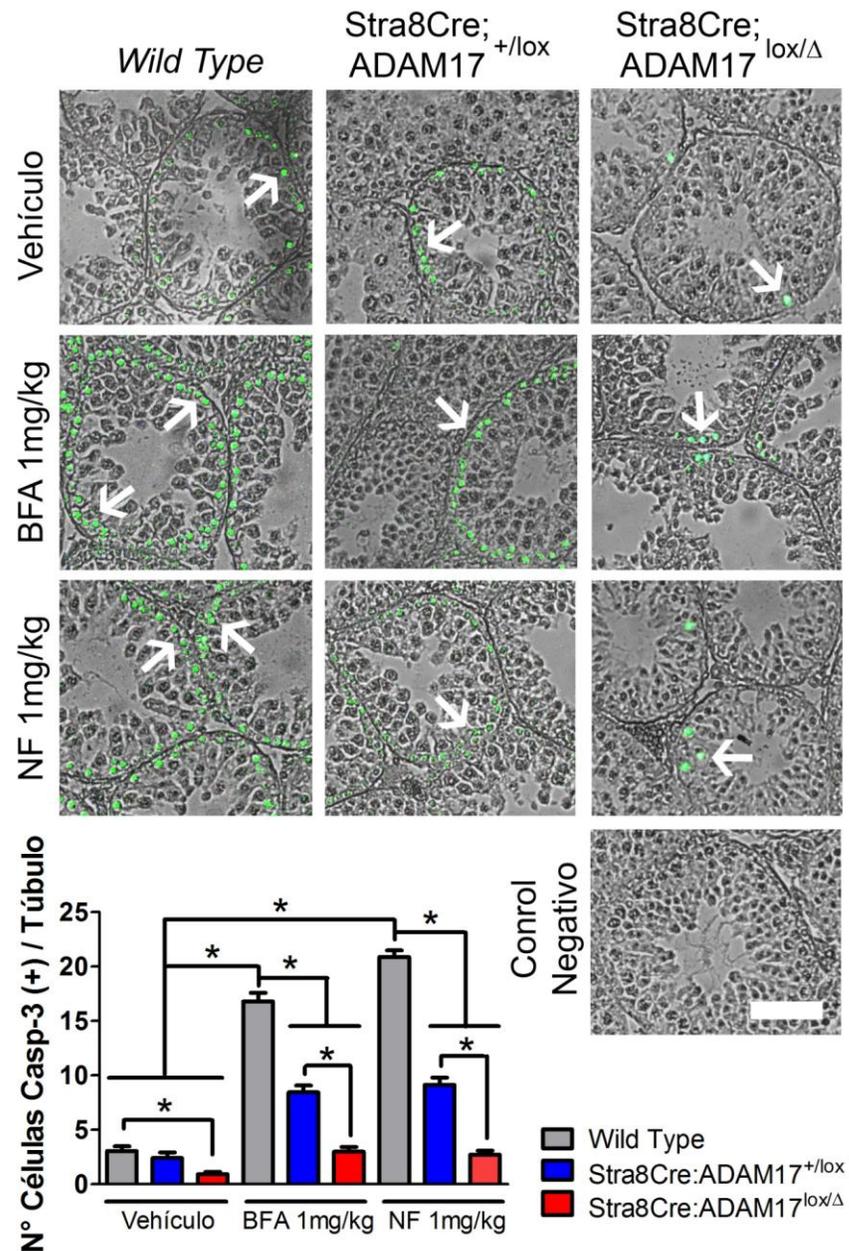
En ratones *wild type* tratados con 1 mg/Kg de BFA o NF se observó un índice apoptótico de  $1,00 \pm 0,06$ , y  $1,22 \pm 0,08$ , respectivamente, el cual se reduce significativamente en un 58% y un 34% en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>+lox</sup> tratados con BFA o NF, ya que su índice apoptótico fue de  $0,42 \pm 0,03$  y  $0,41 \pm 0,03$ , respectivamente. La apoptosis en ratones Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> disminuyó con BFA o NF, observándose valores del índice apoptótico de  $0,24 \pm 0,04$  para los tratados con 1mg/Kg BFA y a  $0,26 \pm 0,03$  para los ratones tratados con 1 mg/Kg NF, es decir, se reduce un 76% y 77%, respectivamente (Fig. 15).



**Figura 15: En ratones  $Stra8Cre;ADAM17^{+/lox}$  y  $Stra8Cre;ADAM17^{lox/\Delta}$  la muerte de células germinales masculinas inducida por BFA y NF es prevenida.**

Índice apoptótico de células germinales determinado por el número de células picnóticas por túbulo seminífero mediante tinción PAS-He. Se observa una reducción significativa del número de células picnóticas inducida por un tratamiento de 24 horas de 1 mg/Kg de BFA o NF en ratones  $Stra8Cre;ADAM17^{+/lox}$  y  $Stra8Cre;ADAM17^{lox/\Delta}$  de 21 días de edad, respecto a los ratones *wild type*. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \* $p < 0,05$ .  $N=3$ , donde se cuantificaron al menos 100 túbulos por N. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM. Barra 50  $\mu$ m.

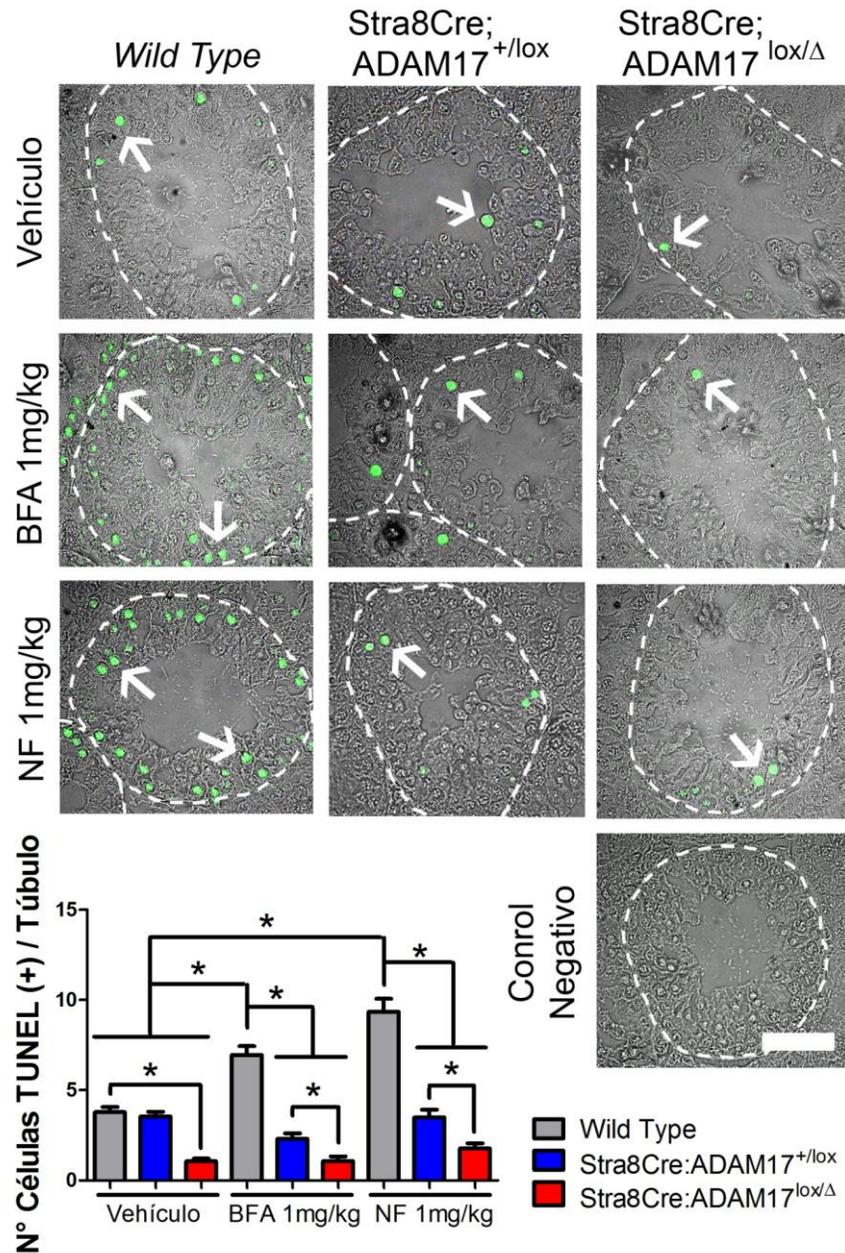
Algo similar se observó con la cuantificación del número de células caspasa-3 activa positiva por túbulo seminífero (Fig. 16, flechas). En donde, ratones *wild type* tratados con 1mg/Kg BFA mostraron  $16,81 \pm 0,79$  células caspasa-3 activa positiva por túbulo seminífero, mientras que este valor disminuyó significativamente en un 50% y en un 82% en los ratones  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{+/lox}$  y  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{lox/\Delta}$  respectivamente, debido a que el número de células caspasa-3 activa por túbulos seminíferos fue de un  $8,45 \pm 0,62$  y  $2,98 \pm 0,44$ . También se observó una disminución en el número de células caspasa-3 activa al comparar estos dos últimos ratones. La misma tendencia se observó en los ratones tratados con 1mg/Kg NF, ya que los ratones *wild type*,  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{+/lox}$  y  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{lox/\Delta}$ , tuvieron  $20,88 \pm 0,60$ ,  $9,13 \pm 0,67$  y  $2,72 \pm 0,37$  células caspasa-3 activa positiva por túbulo seminífero, respectivamente, por lo que hay un 56% y un 80% de disminución de este número de células en los ratones  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{+/lox}$  y  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{lox/\Delta}$  comprado con los ratones *wild type*, respectivamente (Fig. 16).



**Figura 16: La muerte de células germinales masculinas inducida por BFA y NF es prevenida en ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*.**

Número de células caspasa-3 activa positiva por túbulo seminífero determinado por inmunofluorescencia. Se observa una reducción significativa del número de células caspasa-3 activa positiva por túbulo seminífero inducida por un tratamiento de 24 horas de 1 mg/Kg de BFA o NF en ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* de 21 días de edad, respecto a los ratones *wild type*. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \* $p < 0,05$ . N=3, donde se cuantificaron al menos 100 túbulos por N. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM. Barra 50  $\mu$ m.

Respecto a la cuantificación del número de células TUNEL positiva por túbulo seminífero (Fig. 17, flecha). Ratones *wild type* tratados con 1mg/Kg BFA mostraron  $6,96 \pm 0,49$  células TUNEL positiva por túbulo seminífero, lo que disminuyó en un 67% y en un 85% en los ratones  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{+/lox}$  y  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{lox/\Delta}$ , respectivamente, debido a que el número de células TUNEL positivas por túbulo seminífero fue de  $2,30 \pm 0,30$  y  $1,07 \pm 0,26$ , respectivamente. Además, hubo una disminución del 53% al comparar los ratones  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{+/lox}$  y  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{lox/\Delta}$ . Cuando los ratones son tratados con 1mg/Kg NF se observaron  $9,36 \pm 0,70$ ,  $3,45 \pm 0,44$  y  $1,77 \pm 0,28$  células TUNEL positiva por túbulo seminífero en los ratones *wild type*,  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{+/lox}$  y  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{lox/\Delta}$ , respectivamente. Por lo que en los ratones  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{+/lox}$  y  $\text{Stra8Cre;ADAM17}^{lox/\Delta}$  hubo un 63% y un 81% menos de células TUNEL positivas por túbulo seminífero (Fig. 17).



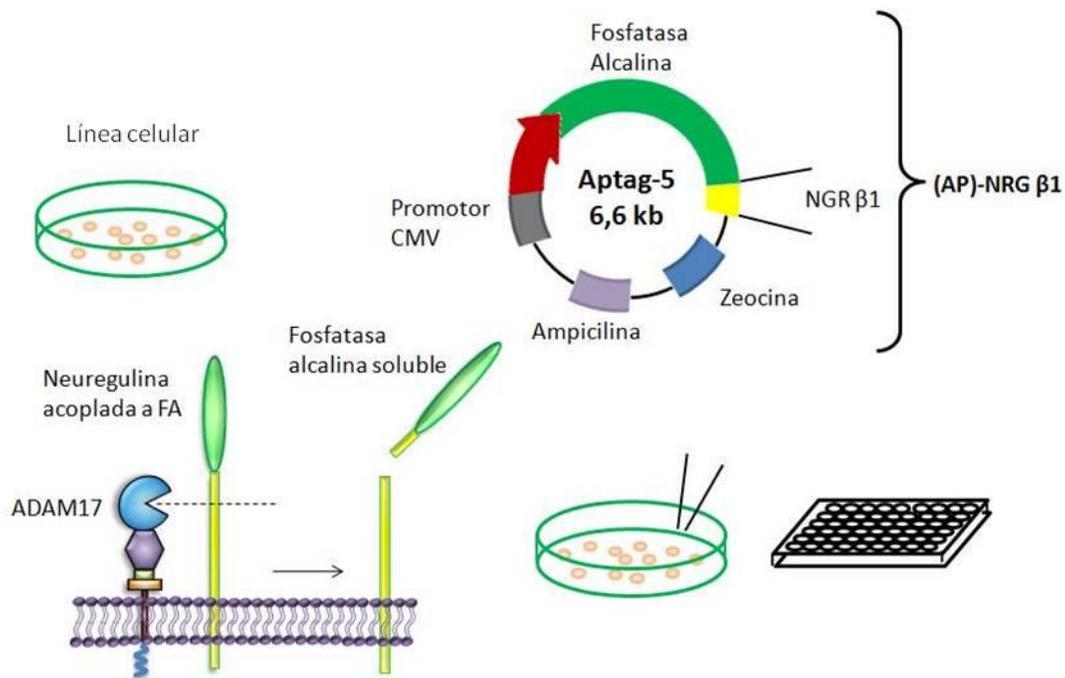
**Figura 17: La muerte, determinada por el ensayo de TUNEL, de células germinales masculinas inducida por BFA y NF es prevenida en ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>*.**

Número de células TUNEL positiva por túbulo seminífero. Se observa una reducción significativa del número de células TUNEL positiva por túbulo seminífero inducida por un tratamiento de 24 horas de 1 mg/Kg de BFA o NF en ratones *Stra8Cre;ADAM17<sup>+/lox</sup>* y *Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup>* de 21 días de edad, respecto a los ratones *wild type*. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. \* $p < 0,05$ .  $N=3$ , donde se cuantificaron al menos 100 túbulos por N. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM. Barra 50  $\mu$ m.

Por lo tanto, la ausencia de un alelo de la *adam17* en las células germinales meióticas y post-meióticas es suficiente para prevenir la apoptosis de células germinales inducida por 1mg/Kg de BFA o NF en ratones de 21 días de edad. Mientras que la total ausencia de la ADAM17 en las células germinales post-meióticas previene tanto la apoptosis fisiológica como la inducida por los xenoestrógenos BFA y NF. Es importante destacar que en estos últimos ratones el nivel de apoptosis cuando son tratados con BFA o NF es similar a los *wild type*, lo que significa que la presencia de la ADAM17 es necesaria en la apoptosis de células germinales inducida por los xenoestrógenos BFA y NF durante la espermatogénesis del ratón.

### **3. Determinar el efecto de los xenoestrógenos BFA y NF sobre la actividad de la ADAM17.**

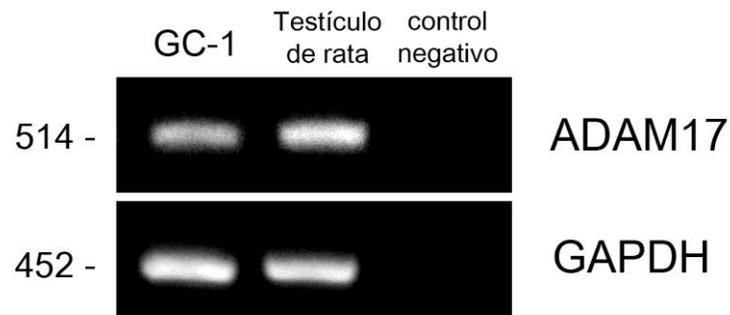
Por los resultados de esta tesis, se sabe que la apoptosis de células germinales masculinas inducida por BFA y NF depende de la ADAM17, sin embargo, aún se desconoce si estos compuestos inducen un aumento de la actividad proteolítica de la ADAM17. Es por ello, que se planteó como objetivo determinar el efecto de estos compuestos sobre la actividad proteolítica de la ADAM17. Para ello, se montó un sistema *in vitro* en que se expresó una proteína que tiene el dominio intracelular, el de transmembrana y parte del dominio extracelular de neuregulina  $\beta 1$  (sustrato de la ADAM17), fusionada a fosfatasa alcalina (FA), mediante la transfección del plasmidio (AP)-NRG  $\beta 1$ . De esta manera, se midió la liberación de FA al medio de cultivo, lo que indirectamente reflejó la actividad proteolítica de la ADAM17 (Fig. 18). Se debe mencionar que este constructo ha sido utilizado exitosamente en trabajos anteriores para medir actividad de la ADAM17 (Horiuchi et al., 2005).



**Figura 18: Esquema representativo de la forma de medición de la liberación de fosfatasa alcalina.**

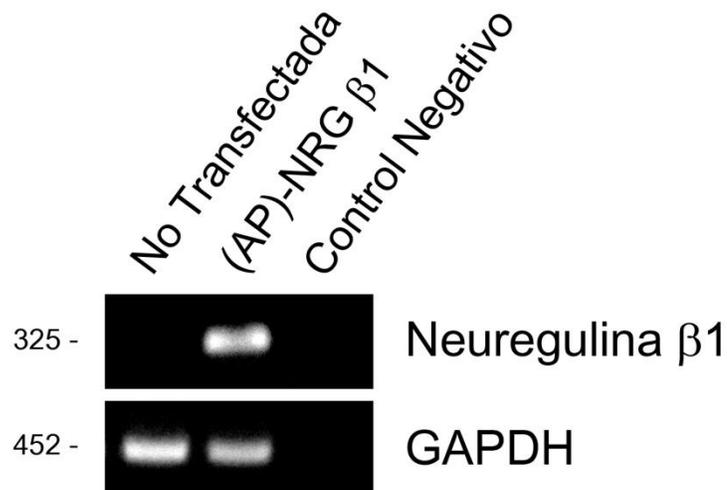
El plasmidio Aptag-5 codifica para una proteína de fusión neuregulina  $\beta$ 1-fosfatasa alcalina (AP)-NRG  $\beta$ 1. Al expresarse esta proteína de fusión en las células transfectadas, la ADAM17 endógena de la célula desprenderá hacia el medio del cultivo al ectodominio de la neuregulina fusionada con la FA. La actividad de la FA liberada al medio de cultivo se determinará mediante un sustrato colorimétrico de FA el cual será medido en un espectrofotómetro.

Como un primer paso se decidió utilizar la línea celular representativa de las células germinales masculinas, la línea GC-1, proveniente de espermatogonia y espermatocitos de ratón. Se determinó si expresa de manera endógena la metaloproteasa ADAM17 y el ligando neuregulina  $\beta$ 1. Para ello, se realizó un RT-PCR para evaluar el mensajero de ambas proteínas, en donde, la línea celular GC-1 expresa la ADAM17 de manera endógena al igual que su control positivo correspondiente a testículo de rata (Fig. 19), y no expresa neuregulina  $\beta$ 1 (Fig. 20). Además, la línea celular GC-1 que fue transfectada con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1, se observa la expresión de neuregulina  $\beta$ 1 24 horas después de la transfección (Fig. 20).



**Figura19: Expresión de la metaloproteasa ADAM17 en la línea celular GC-1.**

RT-PCR en la línea celular GC-1 proveniente de espermatogonias y espermatocitos de ratón, y testículo de rata como control positivo. ADAM17 es expresada en la línea celular de manera endógena. GAPDH como control de carga.

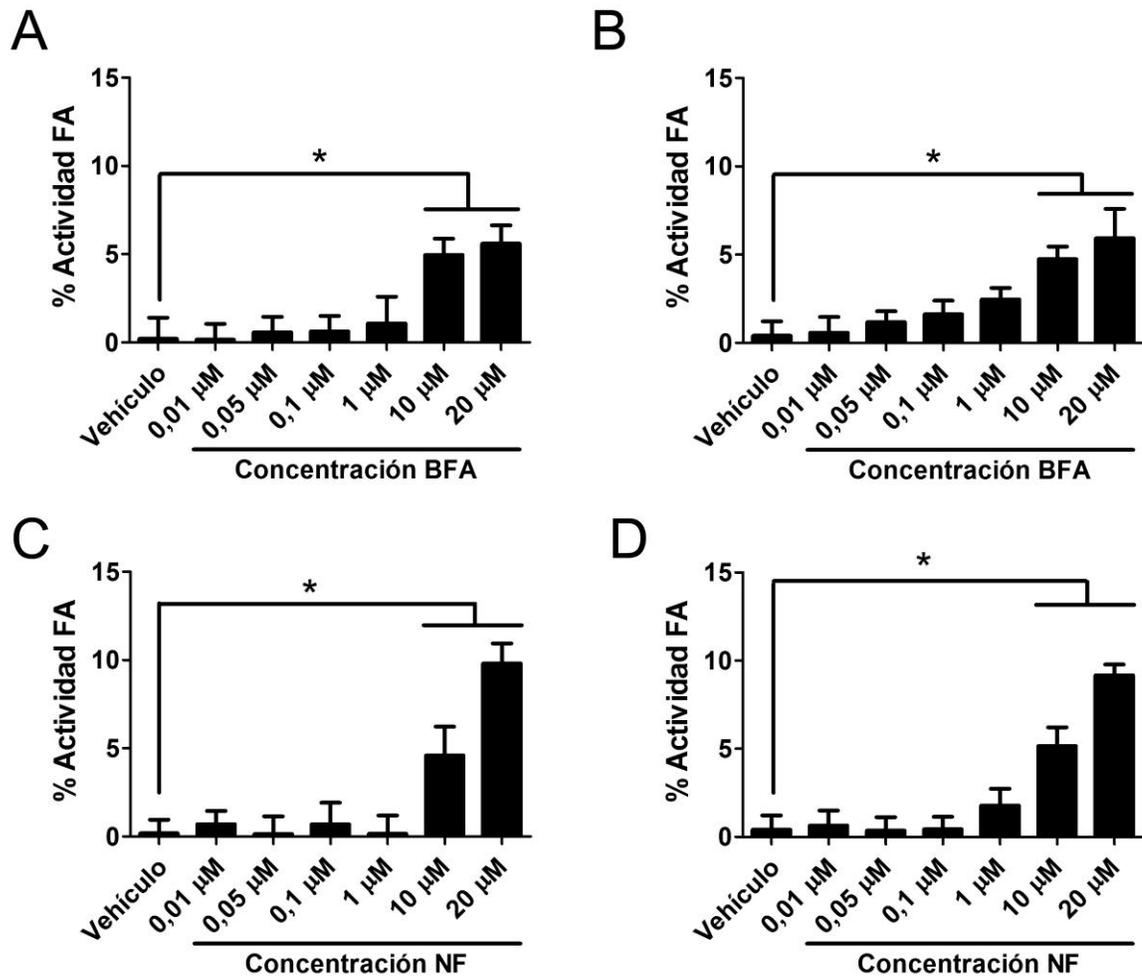


**Figura 20: Expresión de neuregulina  $\beta$ 1 de forma endógena y 24 horas después de la transfección en células GC-1.**

RT-PCR en la línea celular GC-1 sin transfectar y 24 horas post-transfección con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1. La línea celular GC-1 no expresan de manera endógena el mensajero de neuregulina  $\beta$ 1, pero sí luego de 24 horas después de la transfección. GAPDH como control de carga.

La actividad de FA en el medio de cultivo de células GC-1 no transfectadas fue detectada 24 horas después de un tratamiento con concentraciones 10 $\mu$ M y 20  $\mu$ M de BFA o NF (Fig. 21A y C), observándose un aumento de un  $4,95 \pm 0,93\%$ ,  $5,60 \pm 1,04\%$ ,  $4,60 \pm 1,63\%$  y  $9,81 \pm 1,14\%$ , respectivamente. Sugiriendo que las células liberan la enzima endógena a esas concentraciones (Fig. 21C).

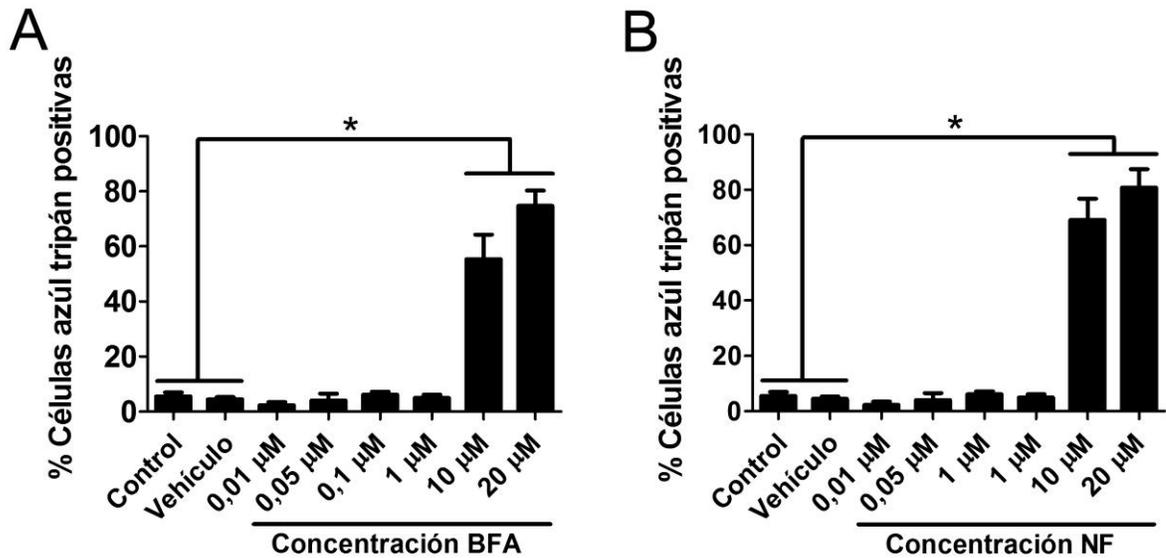
Células GC-1 transfectadas transientemente con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 mostraron un incremento significativo en un  $4,74 \pm 0,72\%$  y  $5,94 \pm 1,66\%$  cuando fueron tratadas con 10 o 20  $\mu$ M de BFA y un incremento de un  $5,16 \pm 1,01\%$  y  $9,17 \pm 0,61\%$  de la actividad de FA cuando fueron tratadas con 10 $\mu$ M y 20  $\mu$ M de NF por 24 horas (Fig. 21B y D).



**Figura 21: BFA y NF inducen liberación de FA endógenas desde las células GC-1.**

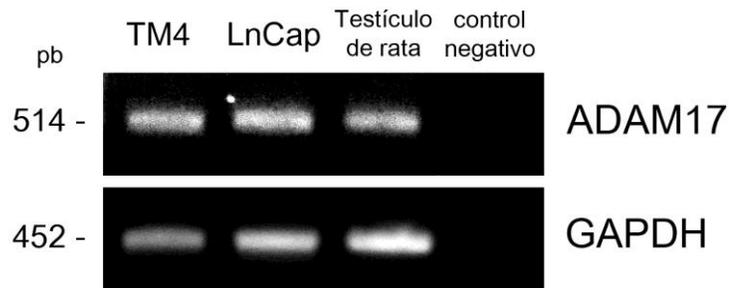
A, C) Células GC-1 no transfectadas muestran un incremento de la actividad de FA (desprendimiento de neuregulina) en el medio de cultivo cuando son incubadas con BFA y NF sólo a las concentraciones de 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M. B, D) La actividad de fosfatasa alcalina incrementa significativamente en el medio de cultivo de células GC-1 transfectadas con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1, cuando las células son incubadas por 24 horas en presencia de 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M de BFA o NF. Vehículo: etanol. El valor del eje y=0 corresponde a la actividad basal de FA. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3, \* p<0,05.

En vista al resultado anterior, el aumento de la actividad de FA en el medio de cultivo inducido por BFA y NF en las células GC-1 transfectadas no corresponde a una medida indirecta de la actividad metaloproteasa de la ADAM17, debido a que se observan valores semejantes de actividad de FA cuando las células GC-1 no transfectadas son tratadas a las mismas dosis y tiempo con BFA y NF. Es por esto, que se quiso determinar si la actividad de FA detectada en el medio de cultivos de células GC-1 no transfectadas estimuladas con BFA o NF, se debe a una liberación de FA endógena porque ambos xenoestrógenos inducen una desestabilización de la membrana celular. Para ello, se determinó la viabilidad celular por azul tripán en las células GC-1 tratadas por 24 horas con concentraciones desde 0,01 hasta 20  $\mu\text{M}$  de BFA o NF. Se determinó un  $55,38 \pm 8,94\%$  y  $74,70 \pm 5,65\%$ , de células azul tripán positivas cuando las células GC-1 fueron tratadas con 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  de BFA y un  $69,14 \pm 7,63\%$  y  $80,76 \pm 6,66\%$  cuando fueron tratadas con 10 o 20  $\mu\text{M}$  de NF (Fig. 22). De esta manera, se corroboró que la actividad de FA observada corresponde a una medición de la FA endógena y no la desprendida desde neuregulina  $\beta 1$ .



**Figura 22: BFA y NF inducen un aumento del porcentaje de células azul tripán positivas.** Células GC-1 no transfectadas muestran un incremento del porcentaje de células azul tripán positivas cuando son incubadas por 24 horas con BFA (A) o NF (B) sólo a las concentraciones de 10 y 20  $\mu$ M. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3, \* p<0,05.

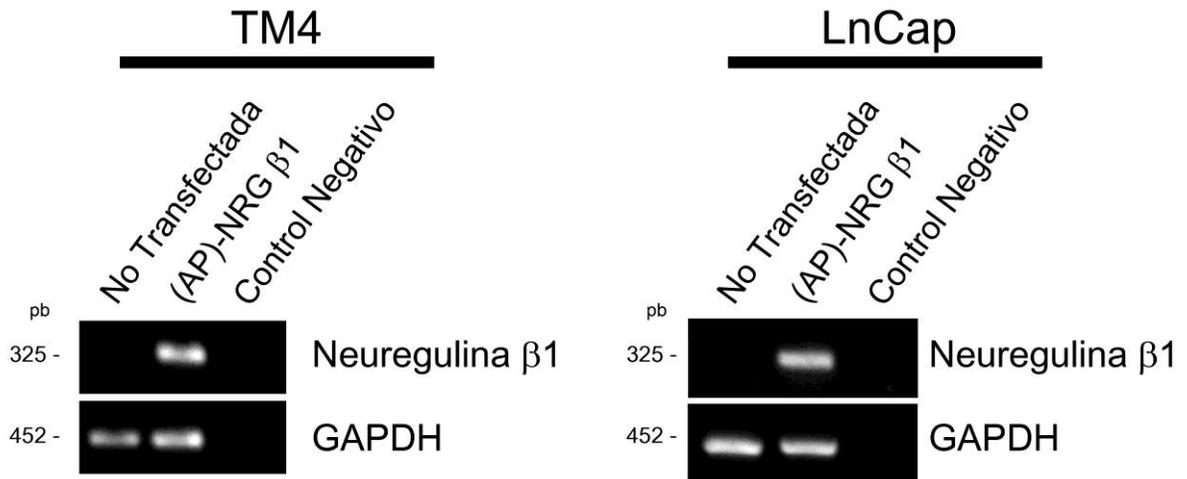
Debido a que la línea celular GC-1 no es un buen modelo para determinar *in vitro* la actividad de la ADAM17, se decidió utilizar dos líneas celulares relacionadas con el sistema reproductor masculino, las cuales son la línea celular TM4 proveniente de células de Sertoli de ratón y la línea celular LnCap proveniente de carcinoma de próstata humana. Ambas líneas celulares expresan la ADAM17 de manera endógena al igual que su control positivo correspondiente a testículo de rata (Fig. 23), y no expresan neuregulina  $\beta$ 1 (Fig. 24).



**Figura 23: Expresión de la metaloproteasa ADAM17 en las líneas celulares TM4 y LnCap.**

RT-PCR en las líneas celulares TM4 y LnCap proveniente de células de Sertoli de ratón y carcinoma de próstata humana, respectivamente, y testículo de rata como control positivo. ADAM17 es expresada en ambas líneas celulares de manera endógena. GAPDH como control de carga.

Cuando las líneas celulares TM4y LnCap fueron transfectadas con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1, se observó la expresión de neuregulina  $\beta$ 1 24 horas después de la transfección (Fig. 24).

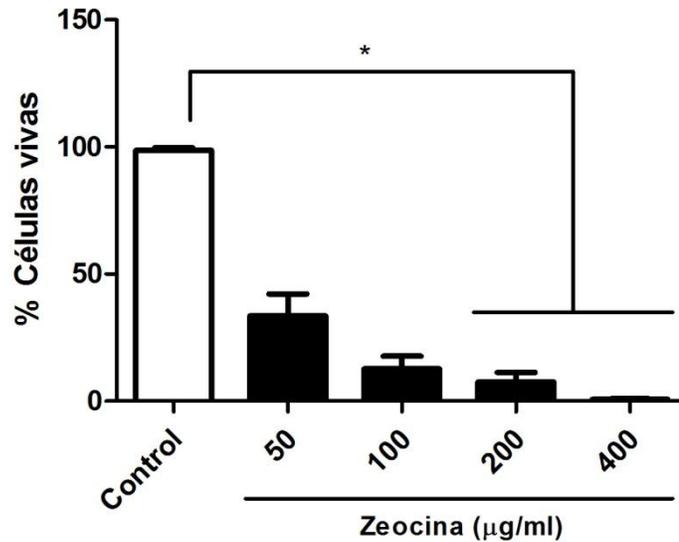


**Figura 24: Expresión de neuregulina  $\beta 1$  de forma endógena y 24 horas después de la transfección en células TM4 y LnCap.**

RT-PCR en las líneas celulares TM4 y LnCap sin transfectar y 24 horas post-transfección con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta 1$ . Ambas líneas no expresan de manera endógena el mensajero de neuregulina  $\beta 1$ , pero sí luego de 24 horas después de la transfección. GAPDH como control de carga.

Cabe destacar que el plasmidio utilizado tiene resistencia al antibiótico zeocina, es por ello que en las líneas TM4 y LnCap se evaluó la sobrevivencia celular mediante el conteo de células muertas por azul tripán luego de 2 semanas de exposición de ambas líneas a diferentes concentraciones de zeocina (50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). La viabilidad celular de TM4 fue nula a los pocos días con la mínima concentración de zeocina recomendada para la selección (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), por lo que se descartó poder utilizar las TM4 para generar una línea celular que exprese establemente (AP)-NRG  $\beta 1$  (dato no mostrado). Por otro lado, la viabilidad celular de LnCap disminuyó a un  $7,7 \pm 3,9\%$  al ser tratadas hasta con 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de zeocina durante dos semanas (Fig. 25). Por lo que se utilizó esta concentración de zeocina para seleccionar las

células que hayan incorporado el plasmidio y generar así una línea celular que exprese establemente (AP)-NRG  $\beta$ 1.

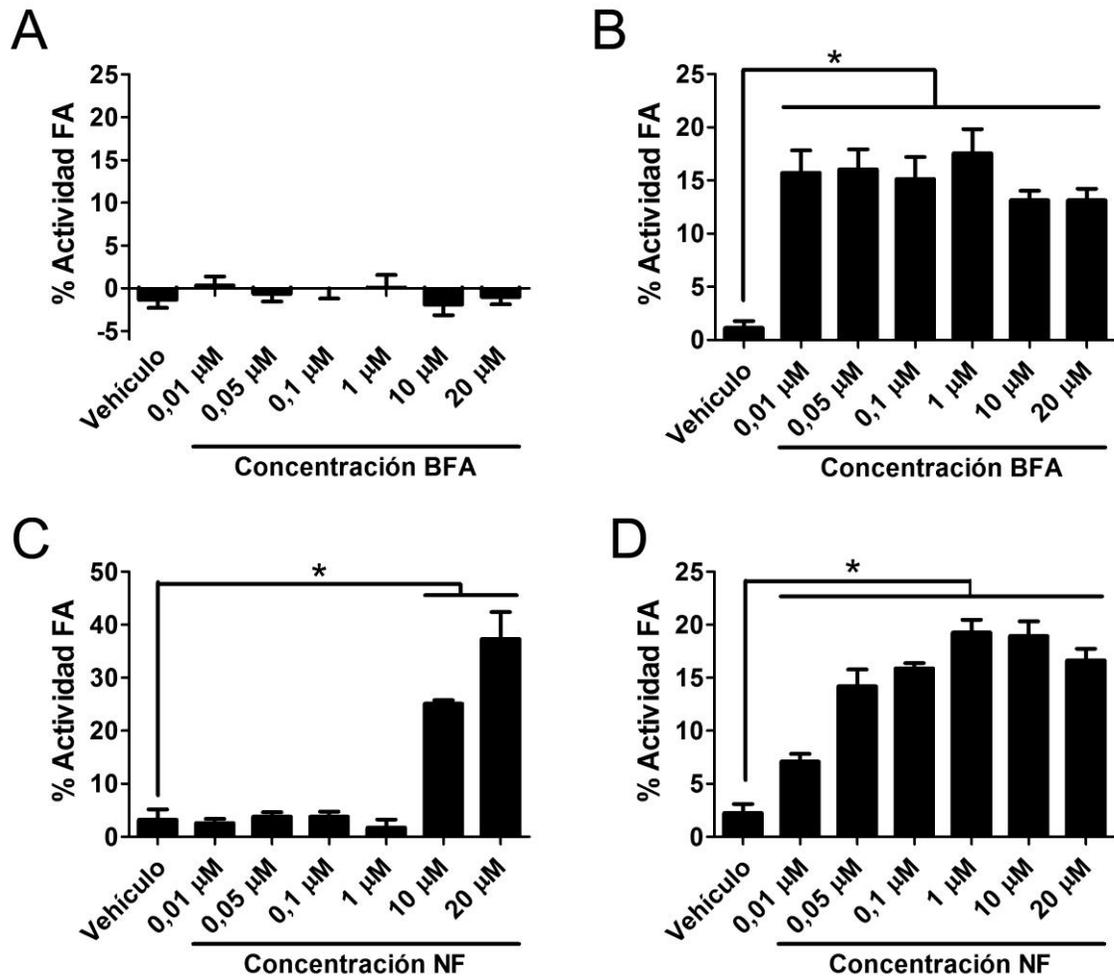


**Figura 25: Zeocina disminuye la viabilidad celular de la línea celular LnCap.**

Ensayo de viabilidad celular con azul tripán. Zeocina a concentración de 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$  disminuye significativamente la viabilidad celular respecto al control de la línea celular LnCap después de 2 semanas de tratamiento constante con el antibiótico. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n = 3, \* p<0,05.

Por lo tanto, para los experimentos futuros, se utilizaron células TM4 transfectadas transientemente con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1, mientras que se utilizaron las células LnCap transfectadas establemente. Por RT-PCR se determinó que por lo menos el mensajero de neureglina  $\beta$ 1 se expresa por 5 días post-transfección cuando las células TM4 son transfectadas transientemente (Apéndice A).

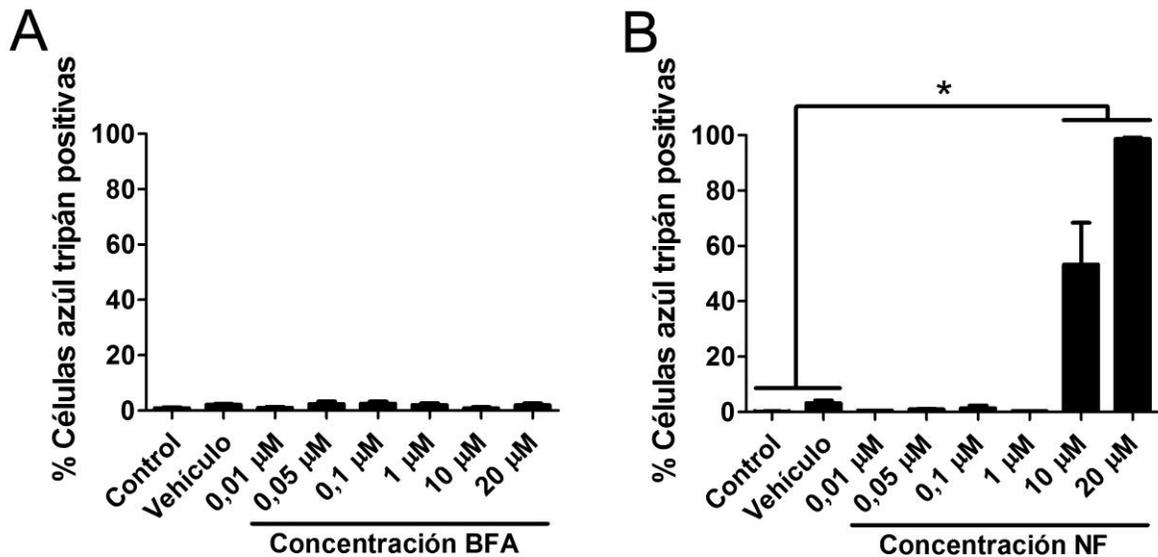
En las células TM4 no transfectadas con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 no se detectó actividad de FA 24 horas después del tratamiento con concentraciones desde 0,01 hasta 20  $\mu$ M de BFA o concentraciones desde 0,01 hasta 1  $\mu$ M de NF (Fig. 26A y C). La actividad de FA aumentó significativamente en un  $25,09 \pm 0,69\%$  y en un  $37,32 \pm 5,09\%$  cuando las células TM4 no transfectadas fueron tratadas con 10 o 20  $\mu$ M de NF, sugiriendo que las células a esas concentraciones libran la FA endógena (Fig. 26C). Las células TM4, que fueron transfectadas transientemente con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 mostraron un aumento significativo de la actividad de FA en el medio de cultivo cuando fueron tratadas con concentraciones desde 0,01 hasta 20  $\mu$ M de BFA o NF por 24 horas (Fig. 26 B y D).



**Figura 26: BFA y NF inducen desprendimiento de neuregulina  $\beta 1$  desde las células TM4 transfectadas.**

A) Células TM4 no transfectadas no muestran actividad de FA (desprendimiento de neuregulina) en el medio de cultivo cuando son incubadas con diferentes dosis de BFA por 24 horas. Sin embargo NF induce un incremento de la actividad de FA sólo a las concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  (C). B, D) La actividad de fosfatasa alcalina incrementa significativamente en el medio de cultivo de células TM4 transfectadas con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta 1$ , cuando las células son incubadas por 24 horas en presencia de 0,01 - 20  $\mu\text{M}$  de BFA o NF. El valor del eje y=0 corresponde a la actividad basal de FA. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3, \* p<0,05.

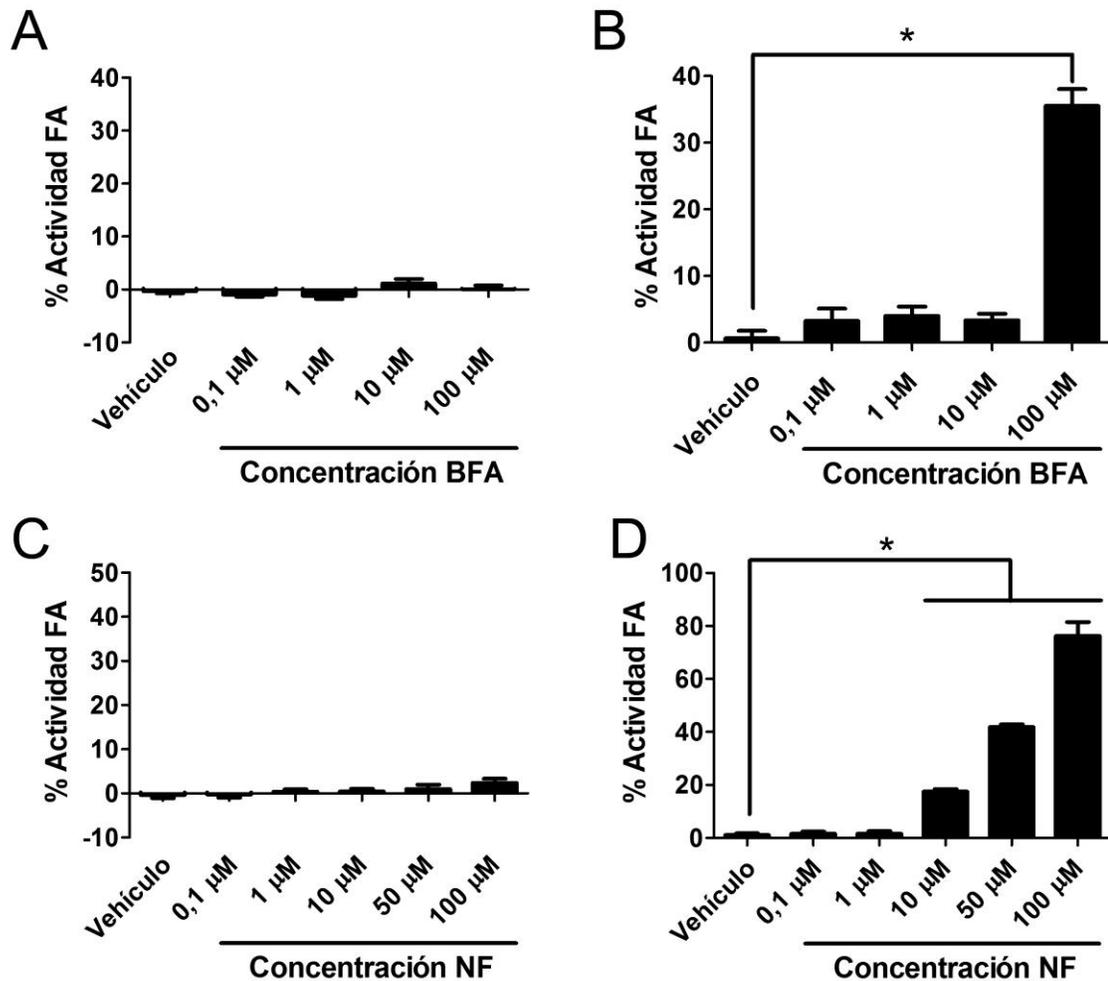
Como un control se determinó el porcentaje de células azul tripán positivas luego de los tratamientos con BFA o NF por 24 horas. Observándose un aumento de un  $53,02 \pm 15,06\%$  y un  $98,63 \pm 0,61\%$  cuando las células son tratadas por 24 horas con concentraciones de 10 o 20  $\mu\text{M}$  de NF, respectivamente (Fig. 27). Sin embargo, no se observaron células azul tripán positivo en ninguna de las concentraciones usadas de BFA ni con NF entre 0,01  $\mu\text{M}$  hasta 1  $\mu\text{M}$ . Por lo tanto, el incremento de la actividad de FA observado con concentraciones desde 0,01  $\mu\text{M}$  hasta 20  $\mu\text{M}$  de BFA o 0,01  $\mu\text{M}$  hasta 1  $\mu\text{M}$  de NF corresponde a un desprendimiento de neuregulina  $\beta 1$  realizado por la metaloproteasa ADAM17 y no corresponde a una detección de FA endógena.



**Figura 27: NF induce un aumento del porcentaje de células azul tripán positivas.**

A) No se observa un aumento del porcentaje de células azul tripán positivas cuando células TM4 no transfectadas son tratadas con concentraciones desde 0,01 hasta 20  $\mu\text{M}$  de BFA por 24 horas. B) Células TM4 no transfectadas muestran un incremento del porcentaje de células azul tripán positivas cuando son tratadas por 24 horas con sólo con las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$  de NF. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3, \* p<0,05.

En las células LnCap no transfectadas con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 no se detectó actividad de FA 24 horas después del tratamiento con concentraciones desde 0,1 hasta 100  $\mu$ M de BFA o NF (Fig. 28 A y C). Las células LnCap que fueron transfectadas establemente con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 mostraron un aumento significativo de la actividad de FA en el medio de cultivo en un  $35,51 \pm 2,53\%$  cuando fueron tratadas con concentraciones de 100  $\mu$ M de BFA 24 horas (Fig. 28B) y en un  $17,50 \pm 0,97\%$ ,  $41,83 \pm 1,07\%$  y  $76,25 \pm 5,20\%$  cuando las células fueron tratadas con concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu$ M de NF, respectivamente (Fig. 28D).

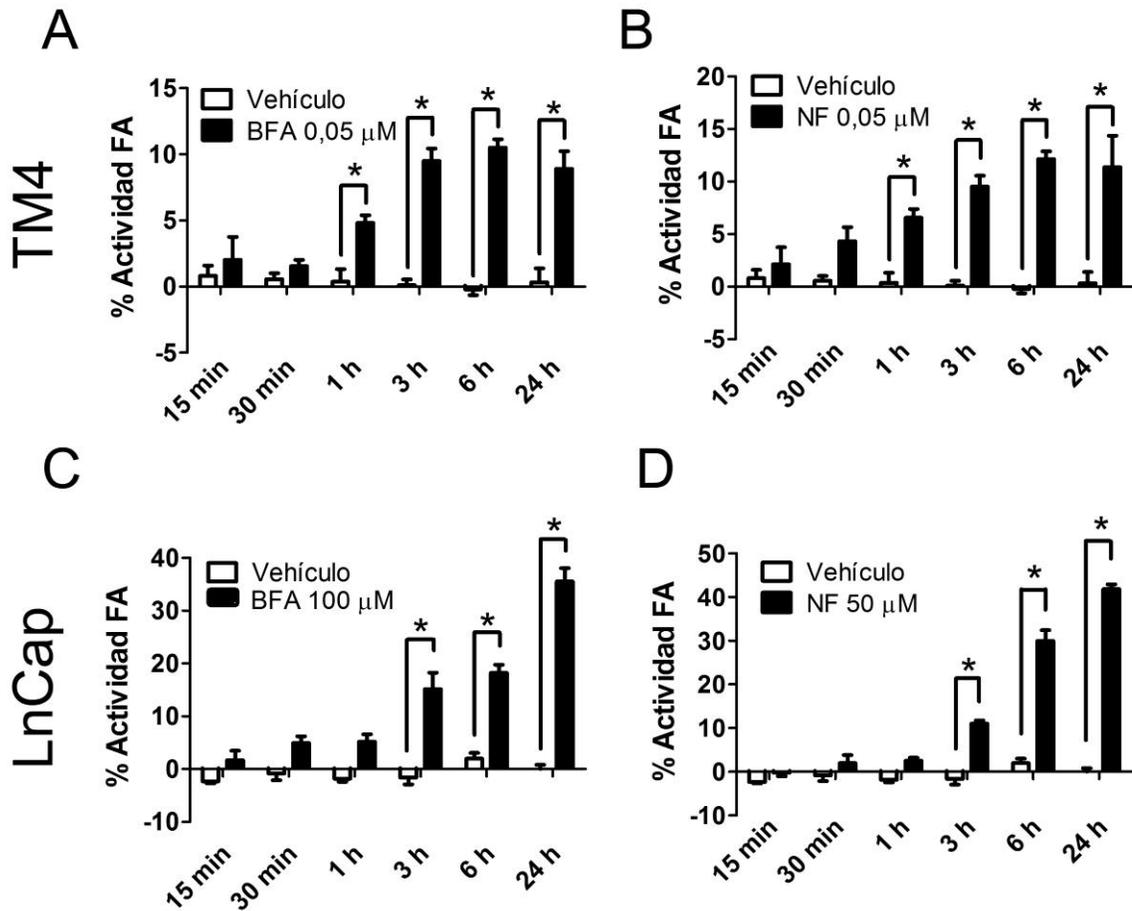


**Figura 28: BFA y NF inducen desprendimiento de neuregulina  $\beta$ 1 desde las células LnCap transfectadas.**

A, C) Células LnCap no transfectadas no muestran actividad de FA (desprendimiento de neuregulina) en el medio de cultivo cuando son incubadas con diferentes dosis de BFA o NF por 24 horas. B, D) La actividad de fosfatasa alcalina incrementa significativamente en el medio de cultivo de células LnCap transfectadas con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1, cuando las células son incubadas por 24 horas en presencia de 100  $\mu$ M de BFA o 10 - 100  $\mu$ M de NF. El valor del eje y=0 corresponde a la actividad basal de FA. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3, \* p<0,05.

En vista a los resultados obtenidos con las células TM4 y LnCap, se puede concluir que son un buen modelo para estudiar si los xenoestrógenos BFA y NF inducen un aumento de la actividad metaloproteasa de la ADAM17, es por ello, que para los experimentos futuros se decidió tratar las células TM4 con una concentración de 0,05  $\mu\text{M}$  de BFA o NF, mientras que las células LnCap con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de BFA y 50  $\mu\text{M}$  de NF.

La actividad de FA en el medio de cultivo comenzó a incrementar desde la hora de tratamiento con 0,05  $\mu\text{M}$  de BFA o NF en las células TM4 transfectadas transientemente con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 (Fig. 29A y B), mientras que en las células LnCap transfectadas establemente la actividad de FA en el medio de cultivo comenzó a incrementar desde las 3 horas de tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de BFA o 50  $\mu\text{M}$  de NF (Fig. 29C y D).

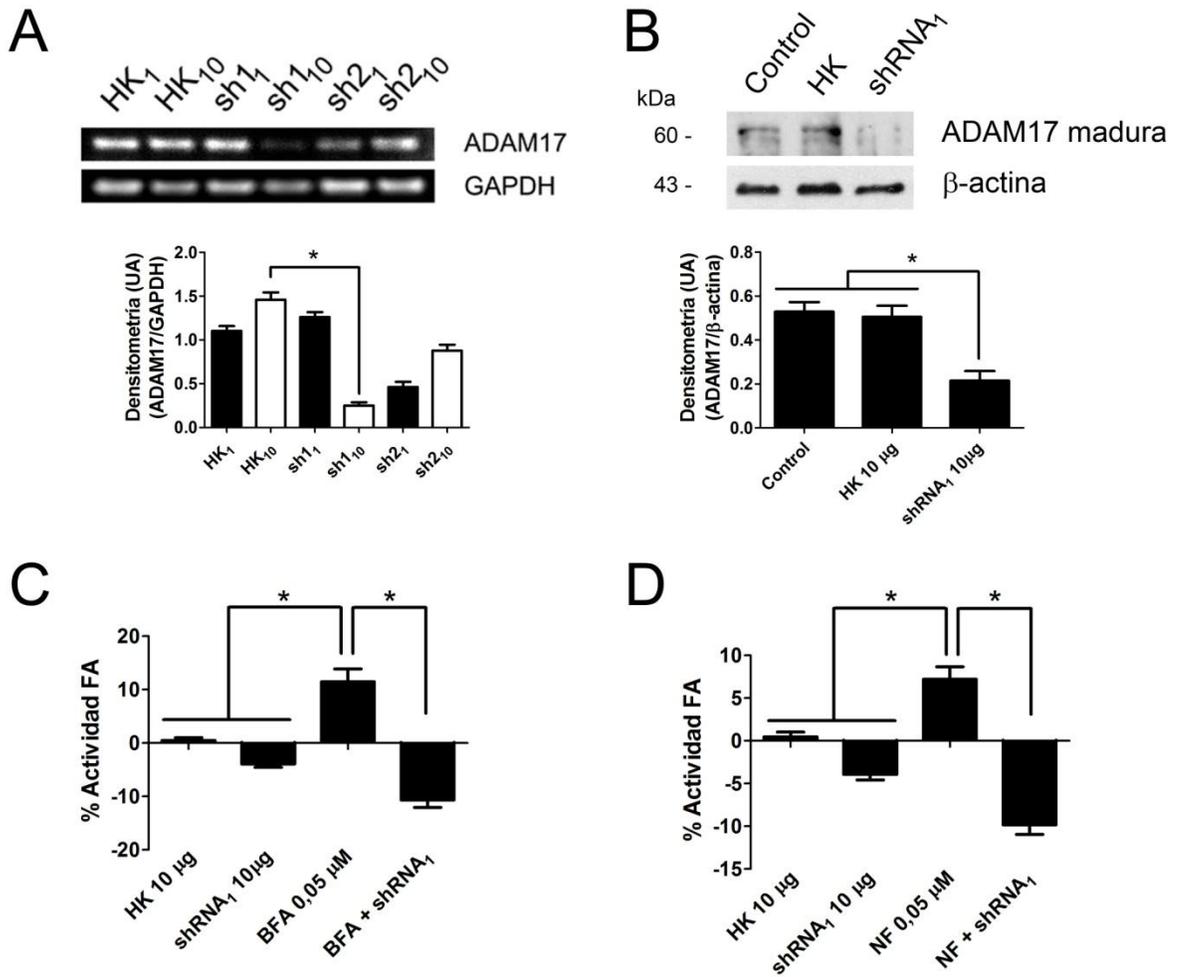


**Figura 29: BFA y NF induce desprendimiento de neuregulina desde la hora en células TM4 y desde las 3 horas en células LnCap.**

Células TM4 transfectadas transientemente con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 fueron tratadas con 0,05  $\mu$ M de BFA (A) o NF (B) durante 15 minutos, 30 minutos, 1, 3, 6 y 24 horas, observándose un aumento de la actividad de FA (desprendimiento de neuregulina) desde la hora de tratamiento. Por otro lado, células LnCap que expresan establemente el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 fueron estimuladas con 100  $\mu$ M de BFA o 50  $\mu$ M de NF durante 15 minutos, 30 minutos, 1, 3, 6 y 24 horas, observándose un aumento de la actividad de fosfatasa alcalina (desprendimiento de neuregulina) desde las 3 horas de tratamiento. El valor del eje y=0 corresponde a la actividad basal de fosfatasa alcalina en el tiempo determinado. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA de dos vías. Media  $\pm$  SEM, n=3, \* p<0,05.

Para definir si la ADAM17 es la enzima responsable el incremento de la actividad de FA en el medio de cultivo después de los tratamientos con BFA o NF, se decidió *knock down* su expresión usando shRNA específicos en contra el mensajero de la ADAM17.

Células TM4 fueron transientemente transfectadas con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 y con 1 o 10  $\mu$ g de shRNA en contra de la ADAM17 (clones sh1 o sh2), o con 1 o 10  $\mu$ g del vector vacío (HK). Los resultados mostraron que 10  $\mu$ g del clon sh<sub>1</sub> fue suficiente para reducir en un 83% los niveles del mensajero de la ADAM17 (Fig. 30A) y en un 60% los niveles de la proteína de la ADAM17 (Fig. 30B) después de 24 horas de transfección. Debido a que el clon sh<sub>2</sub> no redujo significativamente los niveles del mensajero de la ADAM17, se utilizó sólo el clon sh<sub>1</sub>. Finalmente, la transfección con 10  $\mu$ g del clon sh<sub>1</sub> reduce el desprendimiento constitutivo de neuregulina  $\beta$ 1 determinado por la actividad de FA, y también reduce el desprendimiento de neuregulina  $\beta$ 1 después del tratamiento con 0,05  $\mu$ M de BFA o NF por 24 horas (Fig. 30C y D). Es importante mencionar que los niveles de actividad de FA en las células tratadas con los shRNA es menor que cero, sugiriendo que en estas condiciones se reduce incluso la actividad basal de la ADAM17.

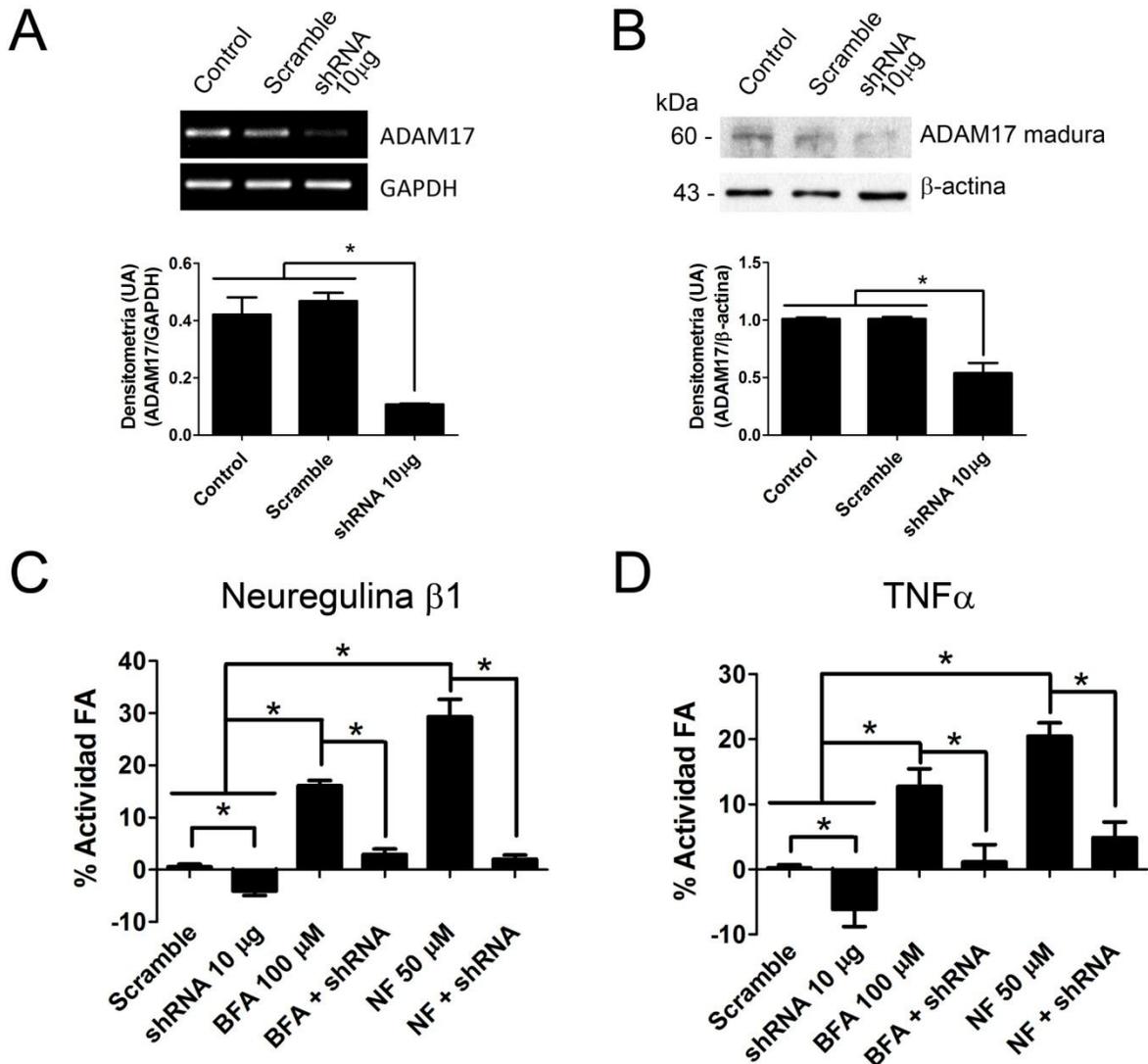


**Figura 30: ADAM17 participa en el desprendimiento de neuregulina inducido por BFA y NF en células TM4.**

Células TM4 transfectadas transientemente con 10 µg de shRNA contra el mensajero de la ADAM17 (clon sh<sub>1</sub>) por 24 horas, disminuyó los niveles de mRNA (A) y de proteínas (B) de la ADAM17. Silenciamiento de la ADAM17 con 10 µg del shRNA<sub>1</sub> en las células transfectadas transientemente con el plasmidio (AP)-NRG β1, reduce significativamente los niveles basales del desprendimiento de neuregulina (actividad de FA) y previene el efecto de BFA (C) y NF (D) después de 24 horas de tratamiento. El valor del eje y=0 corresponde a la actividad basal de fosfatasa alcalina en el tiempo determinado. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media ± SEM, n=3, \* p<0,05.

Por otro lado, células LnCap fueron transfectadas transientemente con 10  $\mu$ g de shRNA en contra el mensajero de la ADAM17 o con 10  $\mu$ g del scramble. Los resultados mostraron que 10  $\mu$ g del shRNA fue suficiente para reducir en un 73% los niveles del mensajero de la ADAM17 (Fig. 31A) y en un 47% los niveles de la proteína de la ADAM17 (Fig. 31B) después de 24 horas de transfección. Cuando células LnCap transfectadas establemente con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 son co-transfectadas con 10  $\mu$ g del shRNA se reduce el desprendimiento constitutivo de neuregulina  $\beta$ 1, determinado por la actividad de FA, y también se reduce el desprendimiento en un 82% y en un 93% después del tratamiento con 100  $\mu$ M de BFA o 50  $\mu$ M de NF por 6 horas, respectivamente (Fig. 31C). Finalmente, en células LnCap transfectadas transientemente con el plasmidio (AP)-TNF $\alpha$ , correspondiente a otro sustrato de la ADAM17 acoplado a FA, y co-transfectadas con 10  $\mu$ g del shRNA en contra el mensajero de la ADAM17, también mostraron una disminución en el desprendimiento constitutivo de TNF $\alpha$ , determinado por la actividad de FA. También se observa un aumento del desprendimiento de TNF $\alpha$  en un 12% y en un 20% después de 6 horas de tratamiento con 100  $\mu$ M de BFA o 50  $\mu$ M de NF, respectivamente, el cual es reducido significativa en un 91% y en un 76% cuando se utiliza 10  $\mu$ g del shRNA en contra el mensajero de la ADAM17, respectivamente (Fig. 31D).

Por lo tanto, se puede sugerir fuertemente que la ADAM17 aumenta su actividad metaloproteasa, determinada por un aumento del desprendimiento de sus sustratos neuregulina  $\beta$ 1 y TNF $\alpha$ , luego de un tratamiento con los xenoestrógenos BFA o NF tanto en líneas celulares TM4 como LnCap.



**Figura 31: ADAM17 participa en el desprendimiento de neuregulina y TNF $\alpha$  inducido por BFA y NF en células LnCap.**

Células LnCap transfectadas transientemente con 10  $\mu$ g de shRNA contra el mensajero de la ADAM17 por 24 horas disminuyó los niveles de mRNA (A) y de proteínas (B) de la ADAM17. Silenciamiento de la ADAM17 con 10  $\mu$ g del shRNA en las células transfectadas establemente con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1 (C) o transfectadas transientemente con el plasmidio (AP)-TNF $\alpha$  (D), reduce significativamente los niveles basales del desprendimiento de neuregulina  $\beta$ 1(C) o TNF $\alpha$  (D), determinado por la actividad de FA, y del efecto de 100  $\mu$ M de BFA y 50  $\mu$ M de NF después de 6 horas de tratamiento. El valor del eje y=0 corresponde a la actividad basal de FA en el tiempo determinado. Vehículo: etanol. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3, \* p<0,05.

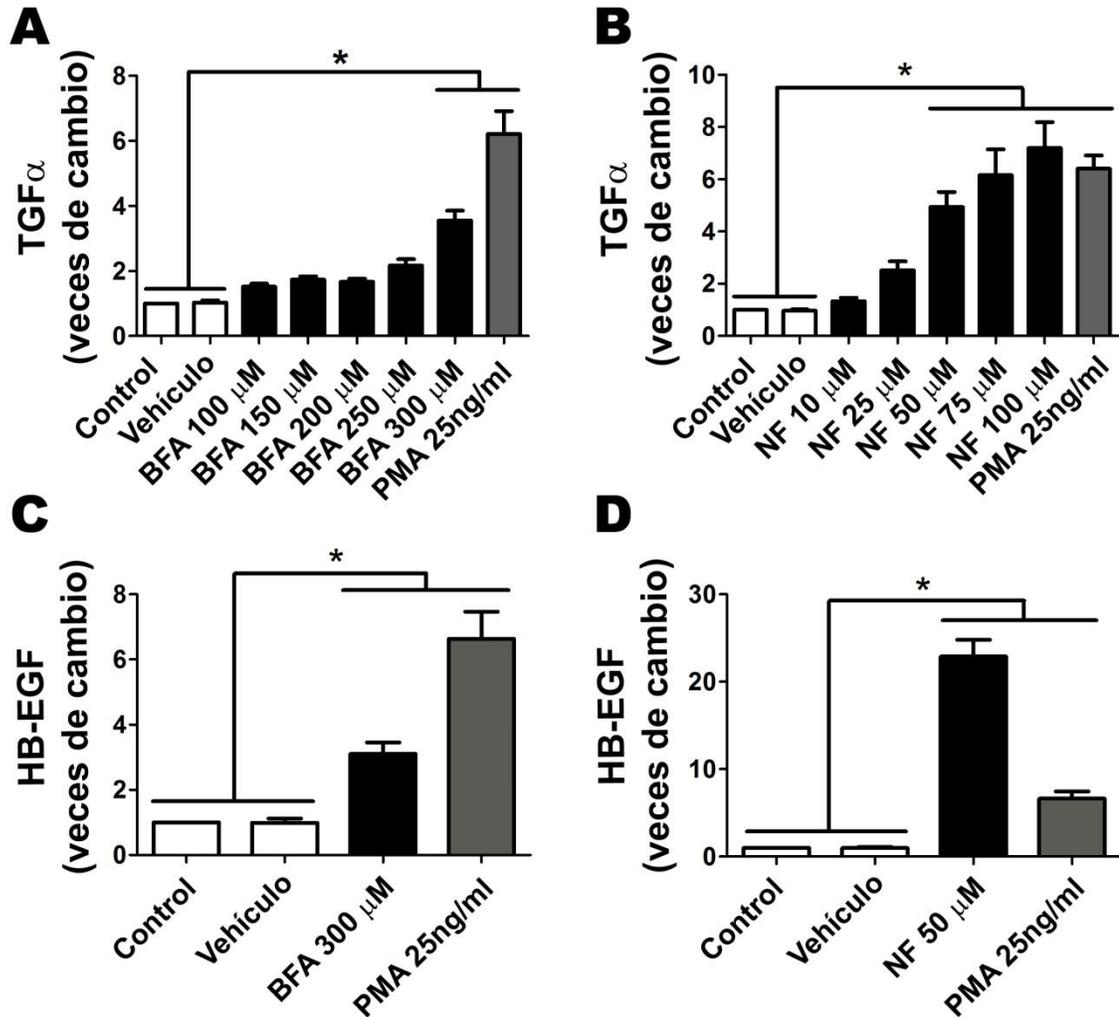
### **iRhom2 como un posible mediador en la inducción de ADAM17 por xenoestrógenos**

La proteinasa de intramembrana iRhom2 es un miembro inactivo de la familia Romboide (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012; Siggs et al., 2012), que fue recientemente identificada como un regulador fundamental de la función y selectividad de su sustrato de la ADAM17 (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012; Siggs et al., 2012; Maretzky et al., 2013; Brooke et al., 2014). Ratones que pierden iRhom1 y iRhom2 se parecen fenotípicamente a los ratones que pierden la ADAM17, sugiriendo que la función principal de las iRhoms1 y 2 es regular la función de la ADAM17 (Li et al., 2015). Por lo tanto, el objetivo fue determinar si las iRhoms1 y 2 son requeridas para la inducción de ADAM17 por los xenoestrógenos BFA y NF.

Debido a que los ratones *knock out* para iRhom1 y iRhom2 son letales, al igual que el ratón *knock out* para la ADAM17, se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón (mEFs) *wild type*, *iRhom1<sup>-/-</sup>*, *iRhom2<sup>-/-</sup>* y *Adam17<sup>-/-</sup>*.

En primer lugar, se determinó si los xenoestrógenos BFA y NF estimulan el desprendimiento de TGF $\alpha$  y HB-EGF en mEFs *wild type*. 300  $\mu$ M de BFA o 50  $\mu$ M de NF es la menor concentración que estimula un incremento significativo del desprendimiento de TGF $\alpha$  desde las mEFs después de 1 hora de tratamiento (Fig. 32A y B). Estas concentraciones de BFA y NF también inducen el desprendimiento de HB-EGF (Fig. 32C y D). El estímulo de BFA fue menos potente que el del phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), un conocido inductor *in vitro* de la actividad metaloproteasa de la ADAM17, en estimular el

desprendimiento de TGF $\alpha$  y HB-EGF (Fig. 32A y C). En el caso de NF el desprendimiento de TGF $\alpha$  fue igual que PMA (Fig. 32B), mientras que el desprendimiento de HB-EGF fue mayor que el estimulado por PMA (Fig. 32D).



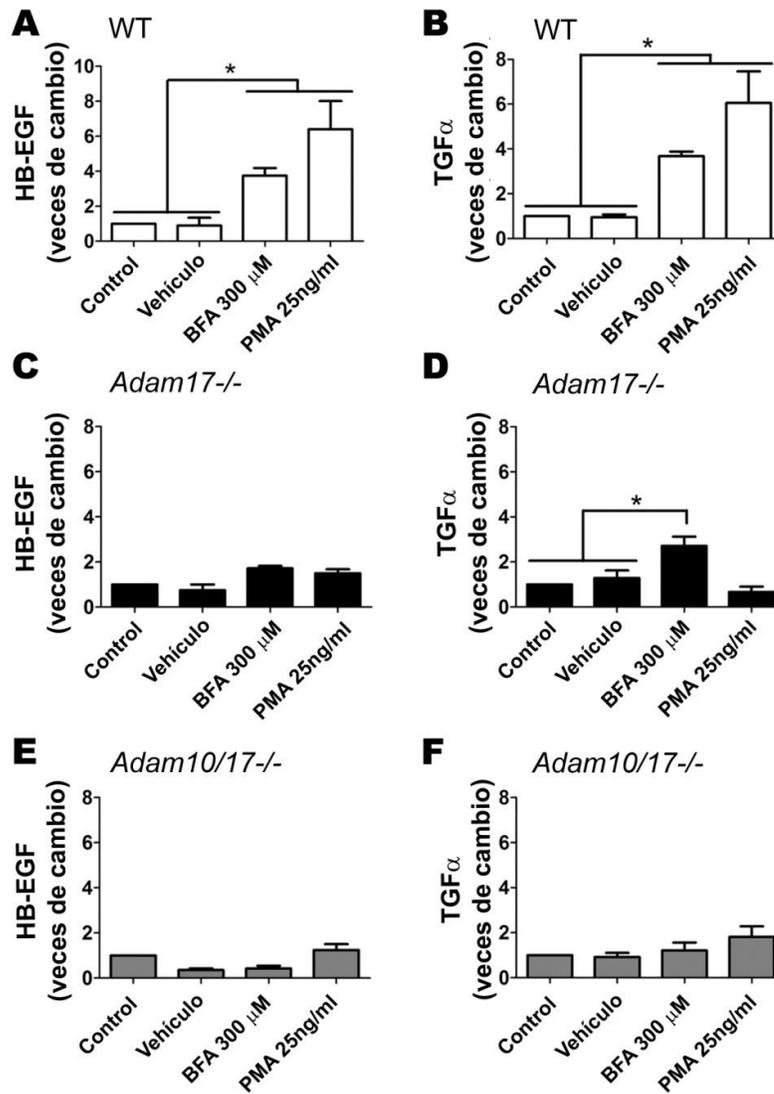
**Figura 32: BFA y NF inducen desprendimiento de TGF $\alpha$  y HB-EGF en células mEFs.**

Células mEFs *wild type* fueron transfectadas transientemente con (AP)-TGF $\alpha$  (A y B) o (AP)-HB-EGF (C y D), y luego estimuladas por 1 hora con diferentes concentraciones de BFA (100, 150, 200, 250 y 300  $\mu$ M) o NF (10, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ M) y PMA (25 ng/ml) como control positivo. El desprendimiento de TGF $\alpha$  (A y B) o HB-EGF (C y D) fue inducido por un tratamiento con 300  $\mu$ M de BFA, 50, 75 y 100  $\mu$ M de NF y PMA 25ng/ml en las células mEFs *wild type*. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=6, Vehículo: Etanol. \* p<0,05.

Luego, utilizando células mEFs *Adam17<sup>-/-</sup>*, se determinó si el desprendimiento de TGF $\alpha$  y HB-EGF inducido por BFA o NF depende de la ADAM17. El desprendimiento de HB-EGF inducido por BFA en las células mEFs *Adam17<sup>-/-</sup>* fue similar al control (sin tratamiento) o aquellas tratadas sólo con vehículo (Fig. 33C) lo que denota una clara diferencia con las mEFs *wild type* (Fig. 33A). Por otro lado, el desprendimiento de TGF $\alpha$  fue significativamente mayor en las mEFs *Adam17<sup>-/-</sup>* tratadas con BFA que las controles o en las vehículo (Fig. 33D), sin embargo, los niveles TGF $\alpha$  liberado inducido por BFA en las mEFs *Adam17<sup>-/-</sup>* fueron menores comparado con las mEFs *wild type* (Fig. 33B). No se detectó el desprendimiento de estos sustratos estimulado por PMA en las células mEFs *Adam17<sup>-/-</sup>*, tal como se había descrito previamente (Horiuchi et al., 2007; Le Gall et al., 2009). Estos resultados sugieren que BFA induce el desprendimiento de HB-EGF como TGF $\alpha$ , sin embargo, sólo el desprendimiento de HB-EGF es exclusivamente dependiente de la ADAM17. Debido a que la ablación de la ADAM17 reduce parcialmente el desprendimiento de TGF $\alpha$  inducido por BFA, es posible que una o más metaloproteasas además de la ADAM17 podría ser activada por BFA.

Interesantemente, se sabe que el influjo de calcio activa la ADAM10 como una metaloproteasa que desprende TGF $\alpha$  y otros sustratos de la ADAM17 en células mEFs *Adam17<sup>-/-</sup>* (Sahin et al., 2004; Le Gall et al., 2009). Debido a que BFA induce una desregulación de la homeostasis de calcio (Lee et al., 2008; Yan et al., 2011), se propone que BFA estimula la liberación de TGF $\alpha$  activando a la ADAM10. Cuando se realizaron experimentos similares en células mEFs doble KO contra la ADAM17 y la ADAM10 (*Adam10/17<sup>-/-</sup>*), se encontró que el desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  fue abolido

completamente (Fig. 33E y F). Estos resultados indican que el desprendimiento de TGF $\alpha$  inducido por BFA en las células mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup> depende de la ADAM10.

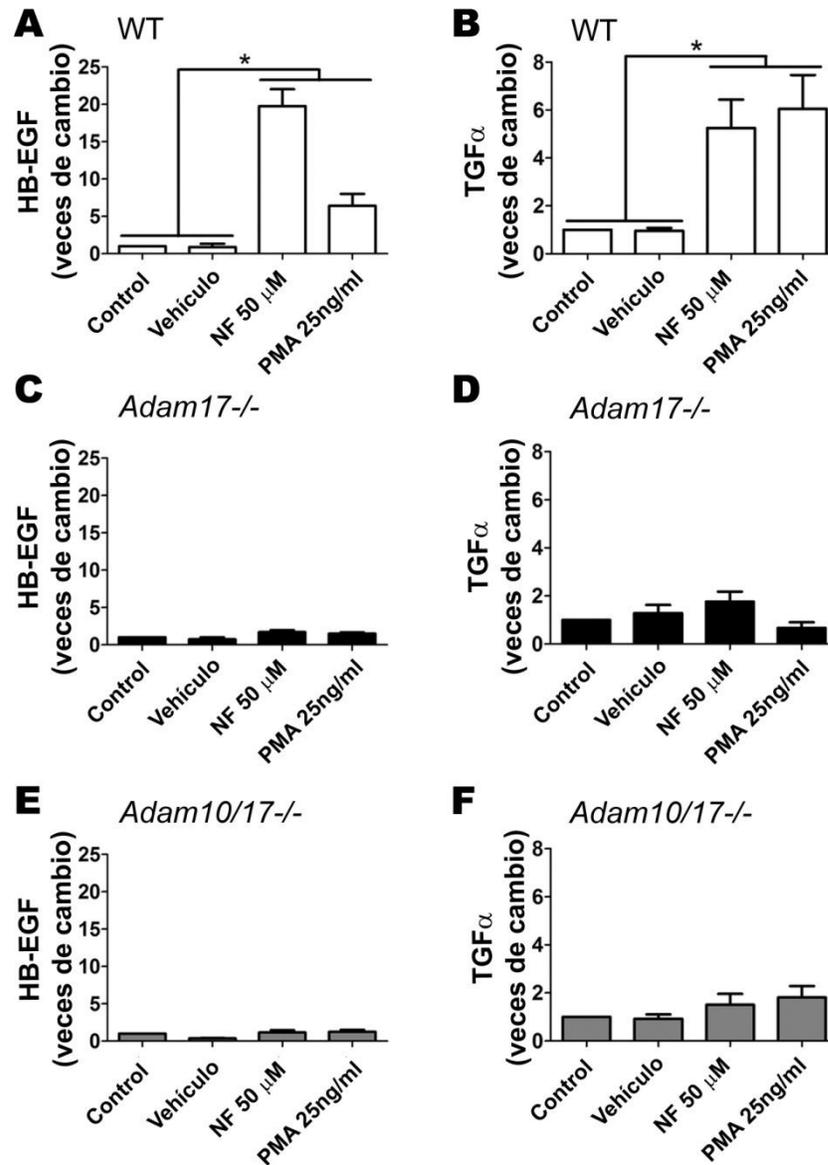


**Figura 33: El desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  inducido por BFA es dependiente de ADAM17.**

Células mEFs *wild type*, *Adam17*<sup>-/-</sup> y *Adam10/17*<sup>-/-</sup> fueron transfectadas transientemente con (AP)-HB-EGF (A, C y E) o (AP)-TGF $\alpha$  (B, D y F), y luego tratadas por 1 hora con 300  $\mu$ M de BFA o PMA (25 ng/ml) como control positivo. BFA induce desprendimiento dependiente de ADAM17 evidenciado por el incremento significativo de HB-EGF (A) o TGF $\alpha$  (B) en las células mEFs *wild type*. Experimentos idénticos fueron realizados en mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup>, en donde el tratamiento por 1 hora con BFA no incrementa el desprendimiento de HB-EGF (C) pero si el de TGF $\alpha$  (D). Sin embargo, cuando células mEFs *Adam10/17*<sup>-/-</sup> fueron tratadas con BFA no incrementó el desprendimiento de HB-EGF (E) o TGF $\alpha$  (F). Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3, Vehículo: Etanol. \* p<0,05.

Experimentos idénticos fueron realizados con un tratamiento de 50  $\mu$ M de NF. En donde se observó que NF indujo el desprendimiento de HB-EGF (Fig. 34A) y TGF $\alpha$  (Fig. 34B). El desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  fue abolido en las células mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup> (Fig. 34C, D). Estos resultados indican que el desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  inducido por NF es completamente dependiente de la ADAM17. Además, el desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  inducido por NF no fue detectado en las células mEFs *Adam10/17*<sup>-/-</sup> (Fig. 34E y F).

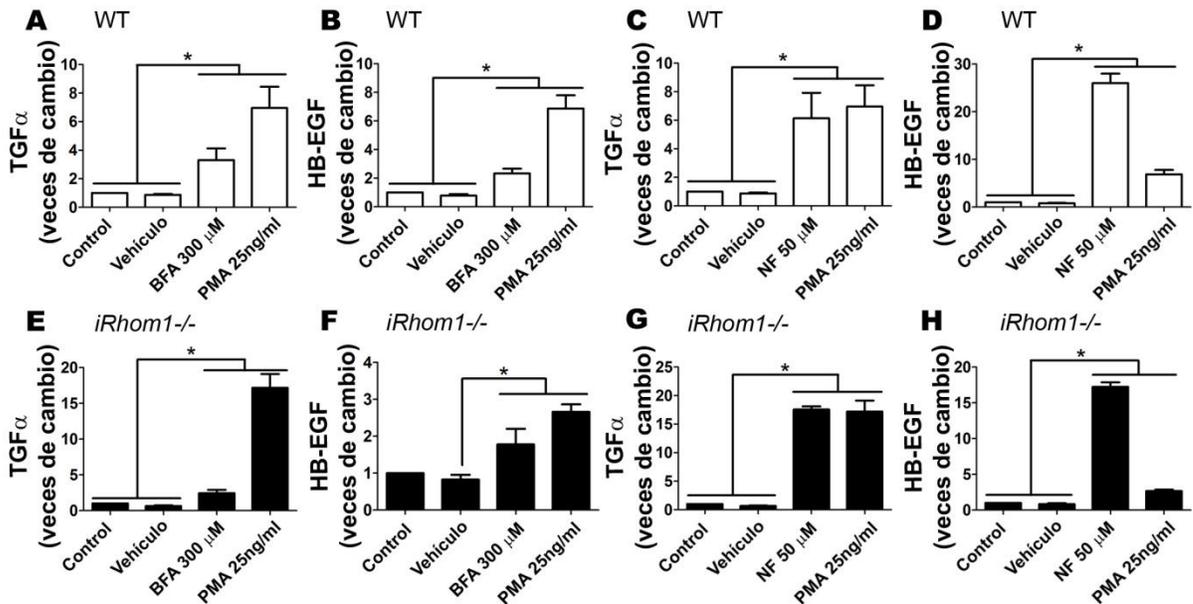
En conclusión, estos resultados sugieren que tanto BFA como NF inducen el desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  en una manera dependiente de la ADAM17. Sin embargo, el desprendimiento de TGF $\alpha$  inducido por BFA también depende de la activación de la ADAM10, al menos en ausencia de la ADAM17.



**Figura 34: El desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  inducido por NF es dependiente de ADAM17.**

Células mEFs *wild type*, *Adam17*<sup>-/-</sup> y *Adam10/17*<sup>-/-</sup> fueron transfectadas transientemente con (AP)-HB-EGF (A, C y E) o (AP)-TGF $\alpha$  (B, D y F), y luego tratadas por 1 hora con 50  $\mu$ M de NF o PMA (25 ng/ml) como control positivo. NF induce desprendimiento dependiente de ADAM17 evidenciado por el incremento significativo de HB-EGF (A) o TGF $\alpha$  (B) en las células mEFs *wild type*. Experimentos idénticos fueron realizados en mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup> y *Adam10/17*<sup>-/-</sup>, en donde el tratamiento por 1 hora con NF no incrementa el desprendimiento de HB-EGF (C y E) ni el de TGF $\alpha$  (D y F). Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3, Vehículo: Etanol. \* p<0,05.

Dado que BFA y NF inducen el desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$ , se evaluó si el desprendimiento de estos sustratos es dependiente de la presencia de iRhom1 o iRhom2, dos reguladores de la ADAM17 recientemente identificados (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012; Siggs et al., 2012; Issuree et al., 2013; Li et al., 2015). Primero, se evaluó el desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  en células mEFs deficiente de iRhom1. 300  $\mu$ M de BFA o 50  $\mu$ M de NF inducen el desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  en estas células comparado con las células mEFs *wild type* (Fig. 35), sugiriendo que el desprendimiento de TGF $\alpha$  y HB-EGF inducido por BFA o NF no requiere iRhom1.



**Figura 35: El desprendimiento de HB-EGF y TGF $\alpha$  inducido por BFA y NF es independiente de iRhom1.**

Células mEFs *wild type* (A-D) y *iRhom1*<sup>-/-</sup> (E-H) fueron transfectadas transientemente con (AP)-TGF $\alpha$  (A, C, E y G) o con (AP)-HB-EGF (B, D, F y H), y luego tratadas por 1 hora con 300  $\mu$ M de BFA, 50  $\mu$ M de NF o PMA (25 ng/ml) como control positivo. BFA (A y B) y NF (C y D) inducen desprendimiento dependiente de ADAM17 evidenciado por el incremento significativo de TGF $\alpha$  (A y C) o HB-EGF (B y D) en las células mEFs *wild type*. Experimentos idénticos fueron realizados en mEFs *iRhom1*<sup>-/-</sup>, en donde el tratamiento por 1 hora con BFA (E y F) o NF (G y H) incrementa el desprendimiento de TGF $\alpha$  (E y G) y el de HB-EGF (F y H). Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3, Vehículo: Etanol. \* p<0,05.

Luego, se determinó si BFA o NF pueden inducir desprendimiento de HB-EGF o TGF $\alpha$  desde células mEFs que han perdido iRhom2 (*iRhom2*<sup>-/-</sup>), y si el rescate de la pérdida de iRhom2 mediante la sobreexpresión de iRhom2 afecta el resultado de este experimento.

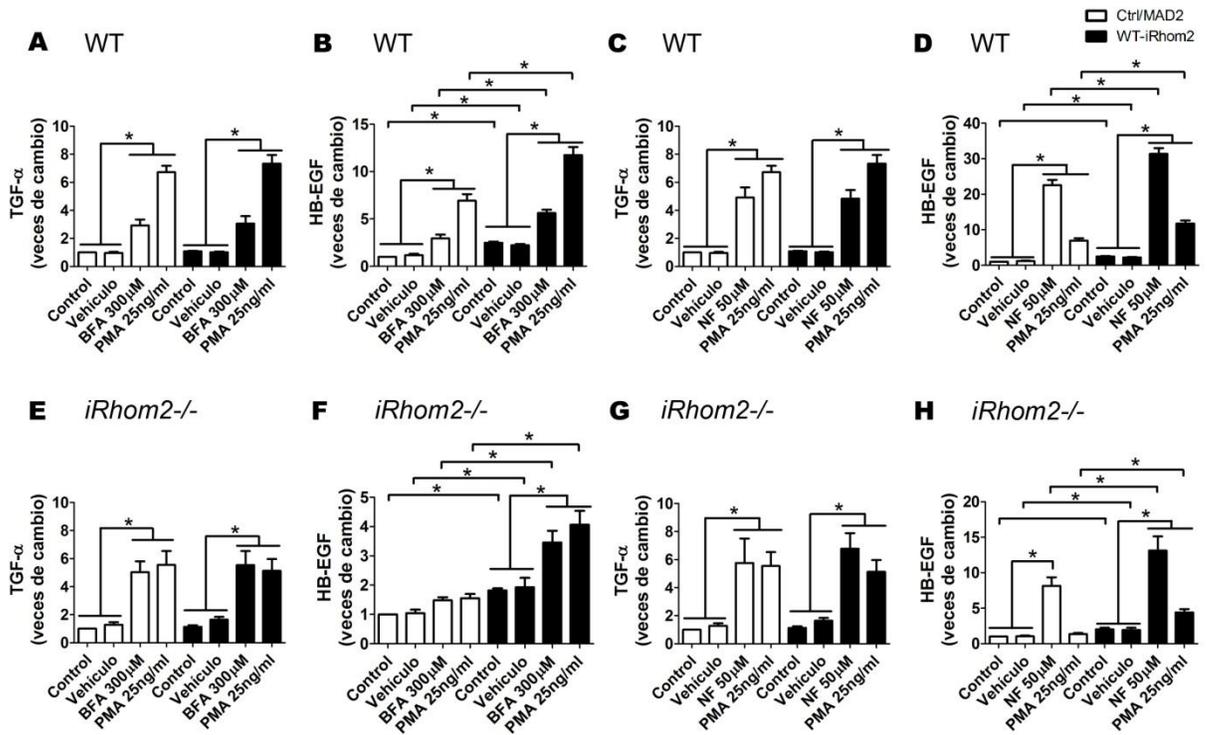
Estudios previos han mostrado que el desprendimiento de HB-EGF depende de iRhom2 y ADAM17, mientras que el desprendimiento de TGF $\alpha$  no depende de iRhom2 pero sí de la ADAM17, luego de un tratamiento de PMA 25 ng/ml por 1 hora (Maretzky et al., 2013). Al transfectar células mEFs *wild type* con el plasmidio que expresa iRhom2 no se observaron cambios en el desprendimiento de TGF $\alpha$  (Fig. 36A y C) cuando son tratadas con 300  $\mu$ M de BFA (Fig. 36A) o 50  $\mu$ M de NF (Fig. 36C) comparadas cuando se transfectaron con el vector vacío (MAD2, Mitotic Arrest Deficient 2). Sin embargo se observó un aumento en el desprendimiento basal de HB-EGF (Fig. 36 B y D) y el desprendimiento estimulado con 300  $\mu$ M de BFA (Fig. 36B) o 50  $\mu$ M de NF (Fig. 36D) las células mEFs *wild type* transfectadas con el plasmidio que expresa iRhom2 comparada con aquellas transfectadas con el vector vacío. Por lo tanto, en células mEFs *wild type* que sobreexpresan iRhom2 se observa un aumento del desprendimiento basal y estimulado de HB-EGF y no de TGF $\alpha$ , indicando nuevamente que el desprendimiento de HB-EGF depende de iRhom2 y no así el desprendimiento de TGF $\alpha$ .

Por otro lado, el tratamiento con BFA induce desprendimiento de TGF $\alpha$ , pero no de HB-EGF en las células mEFs *iRhom2*<sup>-/-</sup> transfectadas con el vector vacío MAD2 (Fig. 36E y F, barras blancas). El tratamiento con PMA muestra el mismo efecto que BFA en estas células. Sin embargo, cuando las células mEFs *iRhom2*<sup>-/-</sup> fueron trasfectadas con iRhom2, tanto BFA

como PMA indujeron desprendimiento de HB-EGF (Fig. 36F, barras negras). Por lo tanto, la presencia de iRhom2 es esencial para el desprendimiento de HB-EGF, pero no de TGF $\alpha$ , en las células mEFs cuando son tratadas con BFA. Estos resultados concuerdan con resultados previos, en donde en ausencia de ADAM17, ADAM10 es necesaria para el desprendimiento de TGF $\alpha$  inducido por el ionóforo ionomicina (Le Gall et al., 2009).

De igual manera, NF indujo el desprendimiento de TGF $\alpha$  de manera independiente de la presencia de iRhom2 (Fig. 36G). Interesantemente, el desprendimiento de HB-EGF inducido por NF fue también independiente de la presencia de iRhom2 (Fig. 36H), mientras que el desprendimiento de HB-EGF inducido por PMA sí requiere de la presencia de iRhom2 (Fig. 36H).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la estimulación con NF puede inducir desprendimiento de HB-EGF incluso en ausencia de iRhom2, y que utilizaría una vía completamente distinta y desconocida hasta ahora para activar la ADAM17.



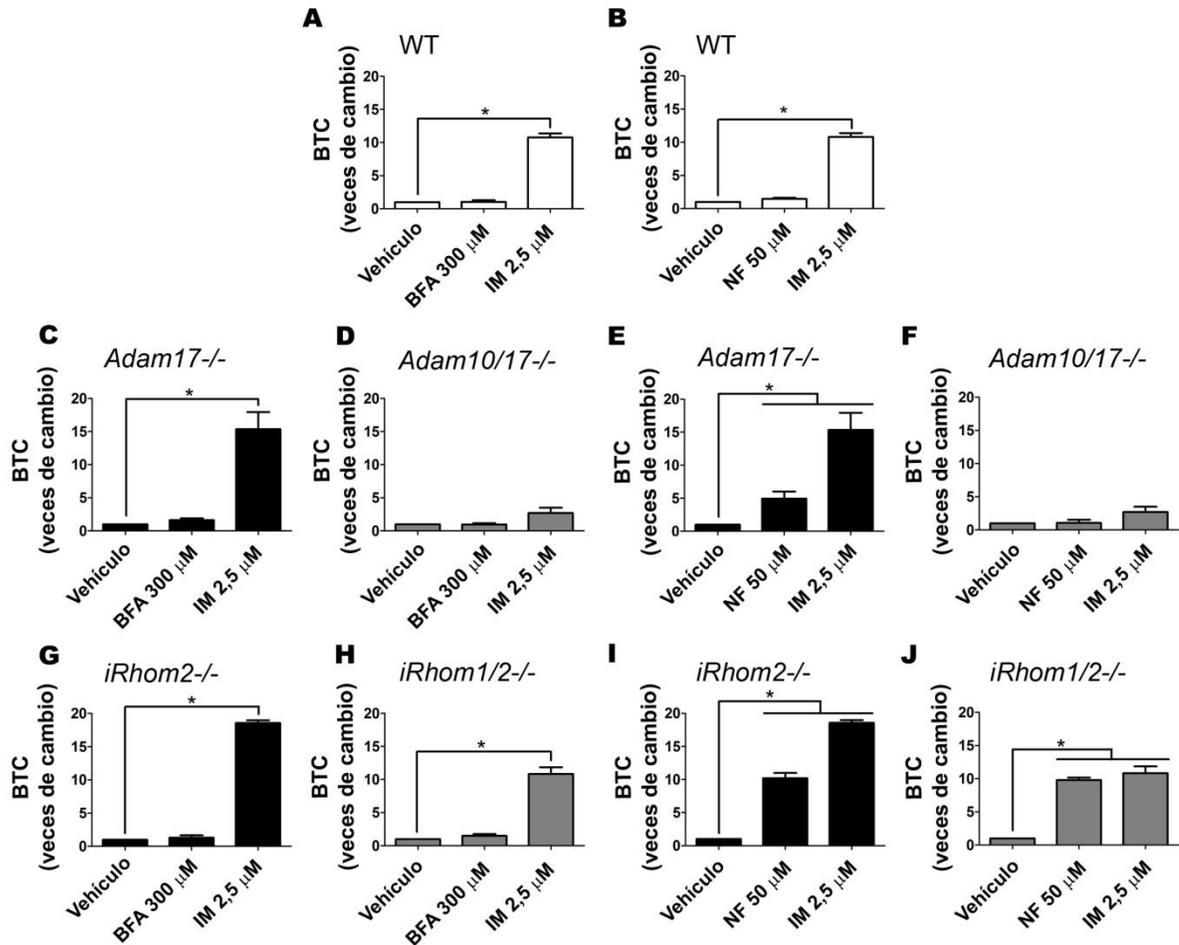
**Figura 36: *iRhom2* es requerida para el desprendimiento de HB-EGF inducida por BFA pero no por NF.**

Células mEFs *wild type* (A-D) y *iRhom2*<sup>-/-</sup> (E-H) fueron co-transfectadas transientemente con (AP)-TGFα (A, C, E y G) o con (AP)-HB-EGF (B, D, F y H), junto con WT-*iRhom2* o el vector vacío MAD2, y luego tratadas por 1 hora con 300 μM de BFA, 50 μM de NF o PMA (25 ng/ml) como control positivo. BFA (A y B) y NF (C y D) inducen desprendimiento dependiente de ADAM17 evidenciado por el incremento significativo de TGFα (A y C) o HB-EGF (B y D) en las células mEFs *wild type*. Experimentos idénticos fueron realizados en mEFs *iRhom2*<sup>-/-</sup>, en donde el tratamiento por 1 hora con BFA (E y F) induce un incremento del desprendimiento de TGFα (E), un sustrato independiente de *iRhom2*, pero no de HB-EGF (F, barras blancas), un sustrato dependiente de *iRhom2*, el cual fue rescatado cuando las células mEFs *iRhom2*<sup>-/-</sup> fueron transfectadas con WT-*iRhom2* (F, barras negras). Sin embargo, la estimulación de 1 hora con 50 μM de NF induce un incremento del desprendimiento de TGFα (G) y HB-EGF (H). Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media ± SEM, n=3, Vehículo: Etanol. \* p<0,05.

Se propone que el desprendimiento de HB-EGF inducido por NF en las células mEFs *iRhom2*<sup>-/-</sup> podría estar mediado por la ADAM10, debido a que como se observó anteriormente, en las células deficientes de la ADAM17, es la ADAM10 quien la reemplaza (Fig. 33). Para responder a esta hipótesis, se usó el plasmidio AP-BTC, el cual expresa el dominio intracelular, el de transmembrana y parte del extracelular del ligando betacelulina (BTC), el cual es un sustrato específico de la ADAM10 (Sahin et al., 2004; Sanderson et al., 2005), fusionado a FA. Los resultados mostraron que ni 300  $\mu$ M de BFA o 50  $\mu$ M de NF indujeron desprendimiento de BTC en las células mEFs *wild type* (Fig. 37A y B). Sin embargo, como se ha descrito previamente, ionomicina, un ionóforo de calcio, indujo desprendimiento de BTC en estas células (Fig. 37A y B) (Sanderson et al., 2005; Maretzky et al., 2013). BFA no indujo el desprendimiento de BTC en las células mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup> o *Adam10/17*<sup>-/-</sup> (Fig. 37C y D), mientras que NF si lo hizo en las células mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup> (Fig. 37E), pero no en las células mEFs *Adam10/17*<sup>-/-</sup> (Fig. 37F). Esto sugiere que la ADAM10 es activada por NF sólo cuando la ADAM17 está ausente (por ejemplo, en las células mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup>), pero no cuando la ADAM17 está presente (por ejemplo, en las células mEFs *wild type*).

Finalmente, se evaluó si *iRhom1/2* es requerida para el desprendimiento de BTC inducido por NF. Los resultados mostraron que el desprendimiento de BTC fue inducido por NF (Fig. 37I y J) pero no por BFA (Fig. 37G y H) en las células mEFs *iRhom2*<sup>-/-</sup> (Fig. 37G e I) o en las mEFs *iRhom1/2*<sup>-/-</sup> (Fig. 37H y J). Por lo tanto, estos resultados sugieren que NF probablemente induce el desprendimiento de BTC activando a la ADAM10 en ausencia de la ADAM17 (mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup>), o en ausencia de *iRhom2* (mEFs *iRhom2*<sup>-/-</sup>), o en ausencia de

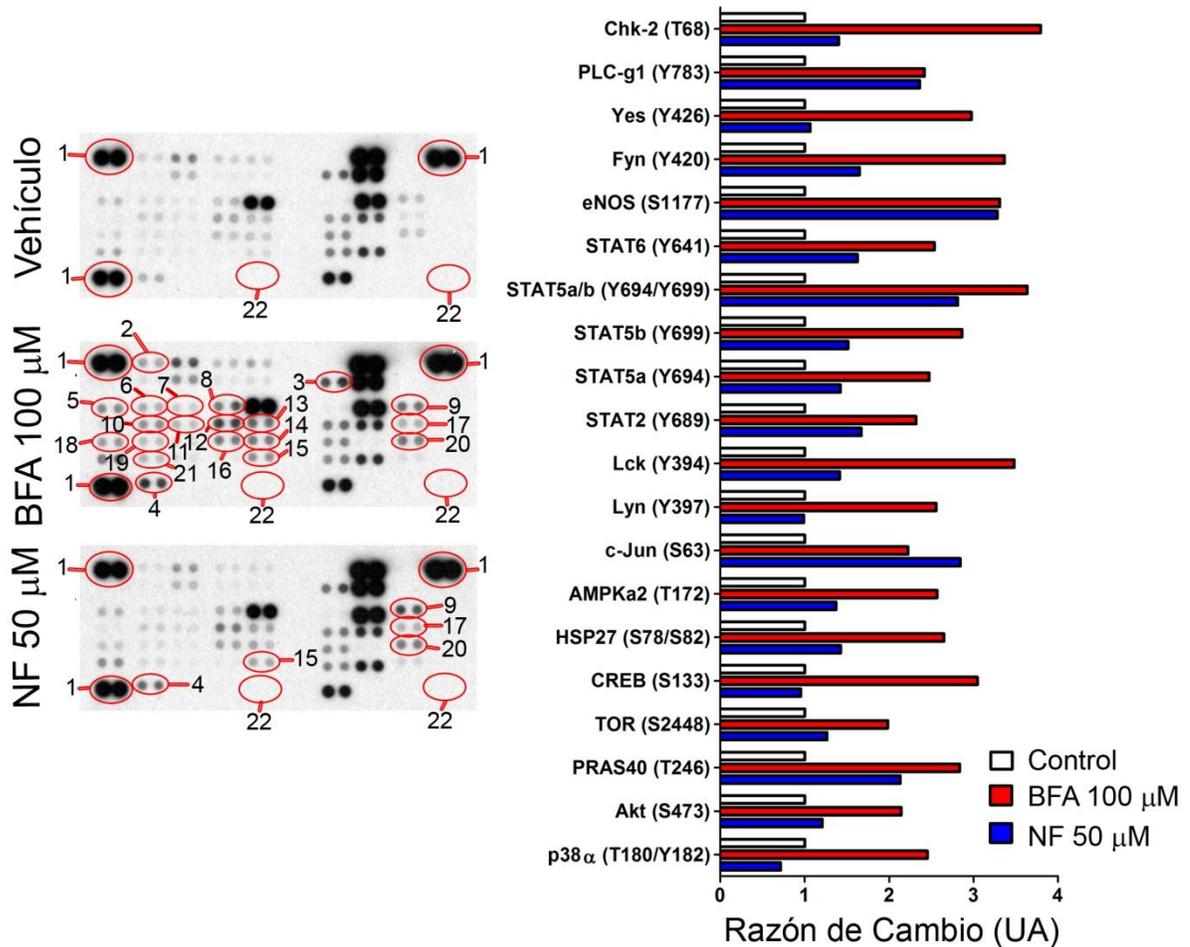
ambas *iRhoms1* y *2* (mEFs *iRhom1/2*<sup>-/-</sup>), las cuales se saben que son reguladores de la ADAM17.



**Figura 37: El desprendimiento de BTC es inducido por NF sólo cuando está ausente ADAM17 o ADAM17 madura.**

Células mEFs *wild type* (A y B), *ADAM17*<sup>-/-</sup> (C y E), *ADAM10/17*<sup>-/-</sup> (D y F), *iRhom2*<sup>-/-</sup> (G e I) y *iRhom1/2*<sup>-/-</sup> (H y J) fueron transfectadas transientemente con (AP)-BTC (A-J), un sustrato de ADAM10, y luego tratadas por 1 hora con 300 μM de BFA, 50 μM de NF o ionomicina (IM 2,5 μM) como control positivo. BFA (A, C, D, G y H) no induce desprendimiento de BTC mediante ADAM10 en todas las células mEFs utilizadas. NF (B y F) no induce desprendimiento de BTC mediado por ADAM10 en las células mEFs *wild type* y *ADAM10/17*<sup>-/-</sup>, respectivamente. Sin embargo, NF induce desprendimiento de BTC mediado por ADAM10 en las células mEFs *ADAM17*<sup>-/-</sup> (E), *iRhom2*<sup>-/-</sup> (I) y *iRhom1/2*<sup>-/-</sup> (J). Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media ± SEM, n=3, Vehículo: Etanol. \* p<0,05.

Estos resultados entregan una nueva evidencia de la capacidad de los xenoestrógenos BFA y NF de activar la ADAM17 o la ADAM10 de manera diferencial dependiendo del contexto celular. Es por ello, que se propone que ambos xenoestrógenos posiblemente están activando diferentes cascadas de señalización. Por esta razón, se determinó de manera general cuáles quinasas se están fosforilando al estimular células LnCap por 15 minutos con 100  $\mu\text{M}$  de BFA o 50  $\mu\text{M}$  de NF, que son las concentraciones a las cuales estos compuestos inducen activación de ADAM17 (ver Figura 31). Para esto, se utilizó un microarreglo de proteínas que indica las quinasas que se activan con ambos estímulos. Se observó que en un tratamiento de 15 minutos con 100  $\mu\text{M}$  de BFA o 50  $\mu\text{M}$  de NF induce la fosforilación de 20 quinasas y 4 quinasas, respectivamente, de un total de 43 quinasas analizadas por sobre dos veces la activación basal en el vehículo (Fig. 38).



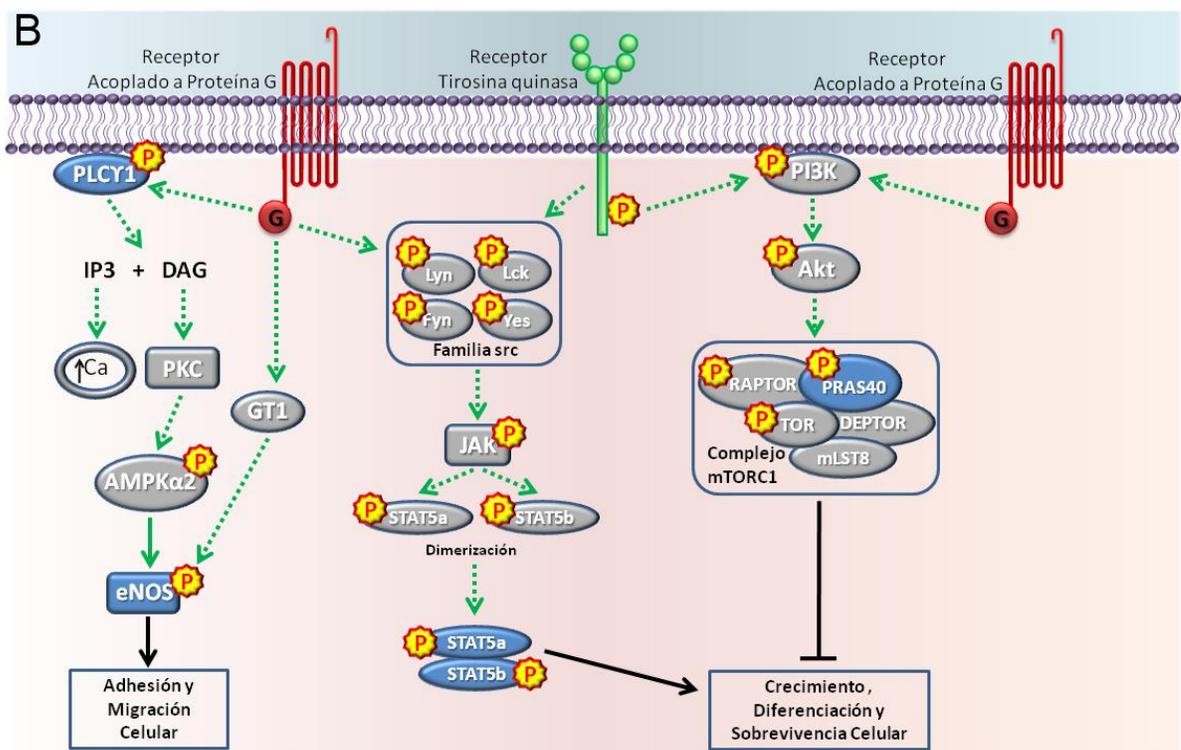
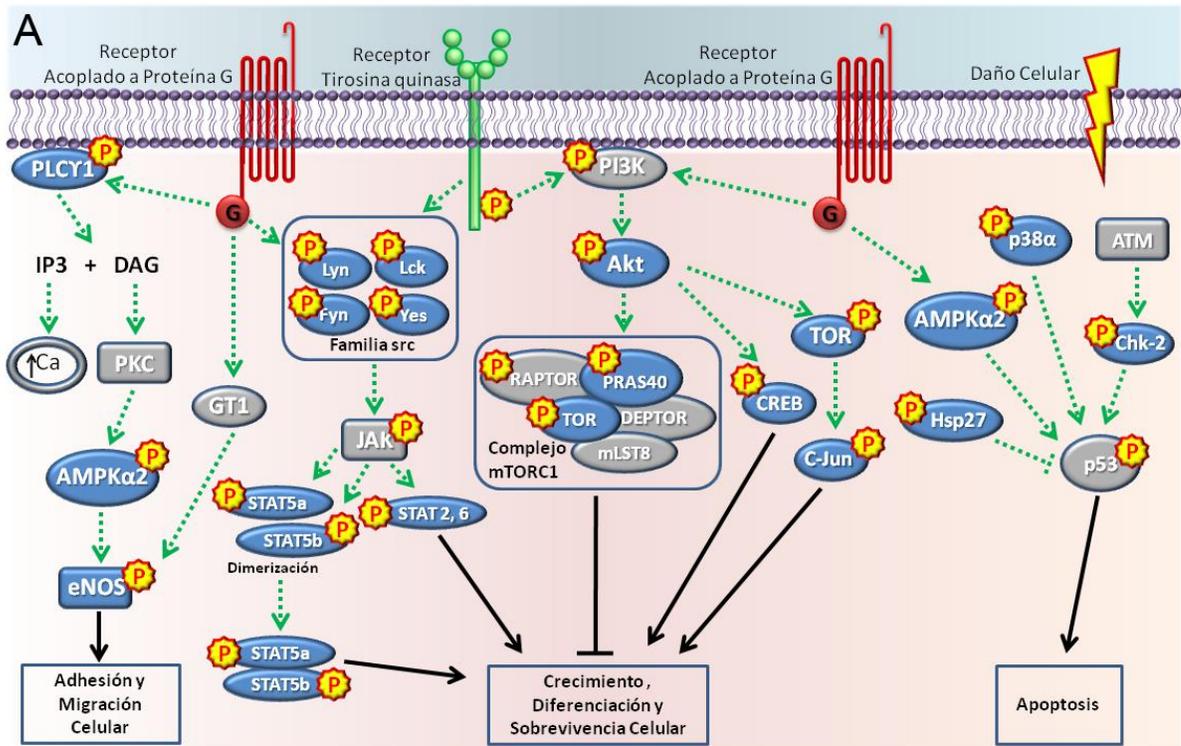
**Figura 38: BFA y NF inducen la fosforilación de diferentes quinanasas.**

Células LnCap fueron tratadas por 15 min con BFA 100  $\mu$ M o NF 50  $\mu$ M. Se determinó la fosforilación de quinanasas con un microarreglo que detecta quinanasas fosforiladas. El gráfico muestra la cuantificación de los pixeles mostrados en el panel de la izquierda. Se seleccionaron aquellas quinanasas cuya razón de cambio fue de dos veces o más respecto al vehículo (etanol). (1) Punto de referencia, (2) p38 $\alpha$  (T180/Y182), (3) Akt (S473), (4) PRAS40 (T246), (5) TOR (S2448), (6) CREB (S133), (7) HSP27 (S78/S82), (8) AMPKa2 (T172), (9) c-Jun (S63), (10) Lyn (Y397), (11) Lck (Y394), (12) STAT2 (Y689), (13) STAT5a (Y694), (14) STAT5b (Y699), (15) STAT5a/b (Y694/Y699), (16) STAT6 (Y641), (17) eNOS (S1177), (18) Fyn (Y420), (19) Yes (Y426), (20) PLC- $\gamma$ 1 (Y783), (21) Chk-2 (T68) y (22) Control negativo (PBS).

Para entender mejor el resultado obtenido, se hizo un análisis de las posibles vías de señalización que se están activando con el estímulo de BFA o NF, observándose que BFA principalmente activa las vías de receptor de membrana acoplado a proteína G, por receptores

tirosina quinasa como el receptor c-kit o de citoquinas pro-inflamatorias como IL2, 3 y 6, y vías que se activan por daño celular, debido a que se observó la fosforilación de PLC $\gamma$ 1, AMPK $\alpha$ 2 y eNOS (Fig. 38), que corresponde a quinasas que participan en la vía de GPCRs (Chen et al., 1999; Nishino et al., 2004; McCudden et al., 2005; Kimura et al., 2006; Rozengurt, 2007; Liu et al., 2012; Al-Jarallah et al., 2014) (Fig. 39A). También se observó la fosforilación de las quinasas Akt, Lyn, PRAS40, TOR, CREB, c-Jun y las STAT: 5a, 5b, el dímero a/b, 2 y 6 (Fig. 38) que corresponden a quinasas que principalmente se activan por receptores tirosina quinasa (Ryan et al., 1997; Du and Montminy, 1998; Brizzi et al., 1999; De Miguel et al., 2002; Kim et al., 2003; Matsui et al., 2004; Sancak et al., 2007; Wang et al., 2007; Yuan and Cantley, 2008) (Fig. 39A). Además, se observó la fosforilación de las quinasas p38 $\alpha$ , Hsp27 y Chk-2 (Fig. 38) que está descrito se activan por daño celular como por calor o tratamientos con drogas anticancerígenas (Sanchez-Prieto et al., 2000; Dorion and Landry, 2002; Tichy et al., 2007; Venkatakrisnan et al., 2008) (Fig. 39A). Por último, se observó la fosforilación de 4 quinasas, Lck, Yes y Fyn (Fig. 38), las cuales se han visto que participan en las vías descritas anteriormente (Krystal et al., 1998; Silva, 2004; New and Wong, 2007) (Fig. 39A).

Por otro lado, un tratamiento de 15 minutos con NF activa principalmente la vía de GPCRs, ya que se fosforilan las quinasas PLC $\gamma$ 1 y eNOS (Fig. 38). Y también la vía del receptor c-kit y citoquinas pro-inflamatorias, debido a que se encuentra fosforilado el dímero STAT5a/b y PRAS40 (Fig. 38 y 39B) (Ryan et al., 1997; Brizzi et al., 1999; McCudden et al., 2005; Kimura et al., 2006; Rozengurt, 2007; Sancak et al., 2007; Wang et al., 2007; Liu et al., 2012; Al-Jarallah et al., 2014).



**Figura 39: Esquema de posibles vías de señalización inducidas por BFA y NF.**

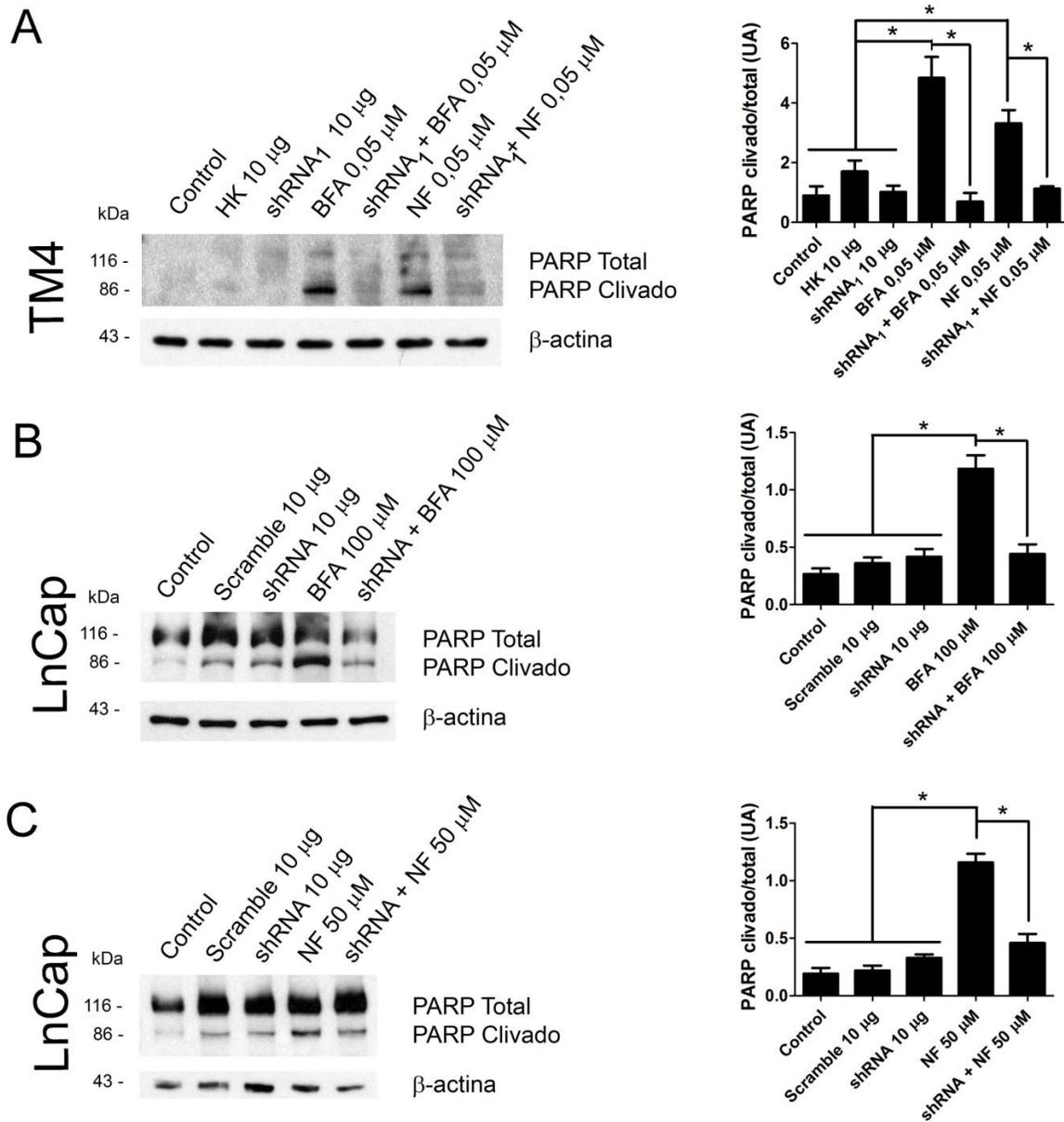
Esquema de las posibles vías de señalización inducidas por un tratamiento de 15 min con BFA (A) o NF (B) en las células LnCap. BFA principalmente activa las vías de receptor de membrana acoplado a proteína G, receptores tirosina quinasa o por daño celular (A), en cambio NF principalmente activa las vías de receptor de membrana acoplado a proteína G y de receptores tirosina quinasa (B). Las proteínas fosforiladas participan en las vías de: (1) adhesión y migración celular, (2) crecimiento, diferenciación y supervivencia celular y (3) apoptosis. En azul se muestran las proteínas que se fosforilan con el tratamiento, mientras que las proteínas en gris corresponden a proteínas que no se observaron fosforiladas o no fueron analizadas pero participan en las vías explicadas.

Por lo tanto, un tratamiento de 15 min con BFA podría estar induciendo por un lado adhesión y migración celular, así como crecimiento, diferenciación y supervivencia, y por otro lado apoptosis (Fig. 39A). Mientras que un tratamiento de 15 min con NF podría estar induciendo adhesión y migración celular, así como crecimiento, diferenciación y supervivencia (Fig. 39B). Finalmente se puede sugerir ambos xenoestrógenos BFA y NF activan vías de señalización similares, pero posiblemente los compuestos actúen con diferentes tiempos de activación.

**4. Estudiar *in vitro* la presencia de la ADAM17 sobre la apoptosis inducida por BFA y NF en líneas celulares.**

Para estudiar *in vitro* la presencia de la ADAM17 sobre la apoptosis inducida por BFA o NF en las células TM4 y LnCap, las líneas celulares fueron transfectadas con 10 ug de shRNA en contra del mensajero de la ADAM17 por 24 horas y luego estimuladas por 24 horas con BFA o NF 0,05  $\mu$ M en el caso de las células TM4, y estimuladas por 6 horas con BFA 100  $\mu$ M o NF 50  $\mu$ M en el caso de las células LnCap. Se eligió esta concentración y tiempo debido a que es la misma con la que se observa un aumento de la actividad de la ADAM17 determinada indirectamente con la actividad de FA en el objetivo anterior.

Mediante *western blot* se observó un aumento de 2,8 y 1,9 veces del fragmento de 86 kDa de PARP, el cual al ser un sustrato de la caspasa-3 indica activación de casapasas y con ello un proceso de apoptosis (Duriez and Shah, 1997), en las células TM4 tratadas con BFA y NF, respectivamente (Fig. 40A), lo que disminuyó en un 83% y en un 97% cuando las células fueron transfectadas previamente con el shRNA en contra del mensajero de la ADAM17, respectivamente (Fig. 40A). Lo mismo fue observado en las células LnCap, ya que un tratamiento con BFA o NF indujo un aumento de 5,4 y 3,2 veces del fragmento de 86 kDa de PARP, lo que fue reducido en un 63% y en un 60% cuando las células fueron transfectadas previamente con el shRNA en contra del mensajero de la ADAM17, respectivamente (Fig. 40B y C).

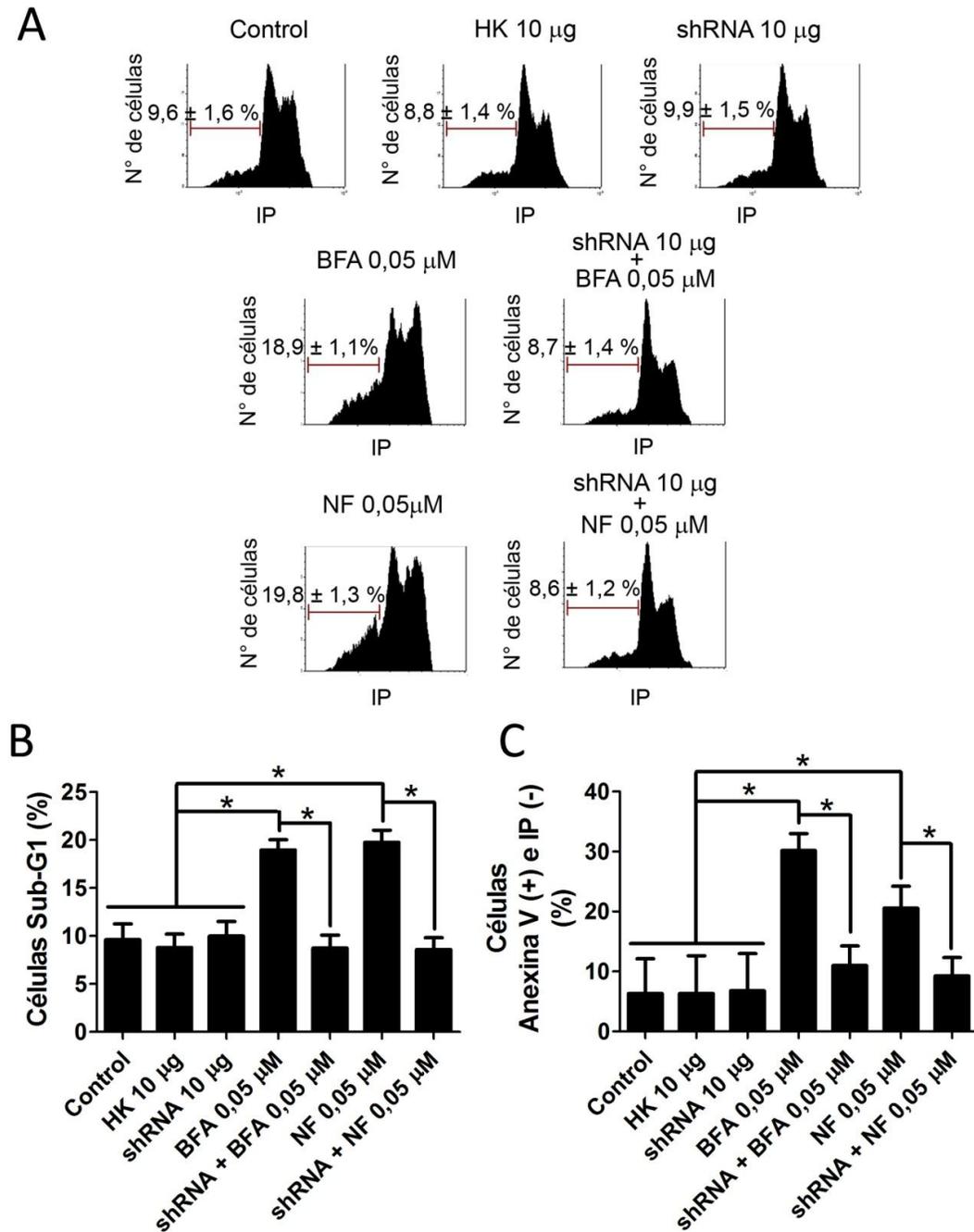


**Figura 40: ADAM17 participa en el aumento de PARP clivado inducido por BFA y NF en las células TM4 y LnCap.**

24 horas de tratamiento con BFA o NF 0,05  $\mu$ M (A) induce un incremento de los niveles proteicos del fragmento de 86 kDa de PARP determinado por *western blot*, lo cual fue prevenido al usar un shRNA en contra del mensajero de la ADAM17 en las células TM4. 6 horas de tratamiento con BFA 100  $\mu$ M (B) o NF 50  $\mu$ M (C) induce un incremento de los niveles proteicos del fragmento de 86 kDa de PARP determinado por *western blot*, lo cual fue prevenido al usar un shRNA en contra del mensajero de la ADAM17 en las células LnCap. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM, n=3. \* p<0,05.

Con el fin de evaluar mejor si la ausencia de la ADAM17 previene la apoptosis inducida por BFA y NF se determinó el porcentaje de células sub-G1 y el porcentaje de células Anexina V positivas e ioduro de propidio (IP) negativas mediante citometría de flujo. Ambos métodos son ampliamente utilizados para evaluar apoptosis, el primero fue descrito por Gong et al. el año 1994, en el cual mediante citometría de flujo se determina el ciclo celular y debido a que en el proceso de apoptosis hay fragmentación del DNA, esta fragmentación puede ser cuantificada por la población de células observadas en la fase del ciclo celular sub-G1 al incubar las células con previamente con IP (Gong et al., 1994). En el segundo ensayo se determinó por citometría de flujo el porcentaje de células Anexina V positivas e IP negativas, debido a que se sabe que durante la apoptosis hay externalización de fosfatidilserina, se utiliza Anexina V, la cual se une a la fosfatidilserina (Vermees et al., 1995), marcada con un fluoróforo para cuantificar la externalización de este fosfolípido.

Mediante citometría de flujo se observó un aumento de 2,1 y 2,2 veces en el porcentaje de células sub-G1 cuando células TM4 fueron tratadas por 24 horas con BFA o NF 0,05  $\mu$ M, respectivamente, lo cual disminuyó en un 54% y en un 57% al transfectar previamente las células con un shRNA en contra de la ADAM17, respectivamente (Fig. 41A y B). Cuando se evaluó el porcentaje de células Anexina V positivas e IP negativas, se observó un aumento de 4,4 y 3,0 veces en el porcentaje de estas células cuando fueron tratadas por 24 horas con BFA o NF 0,05  $\mu$ M, respectivamente, lo cual disminuyó en un 64% y en un 55% al transfectar previamente las células con un shRNA en contra de la ADAM17 (Fig. 41C).

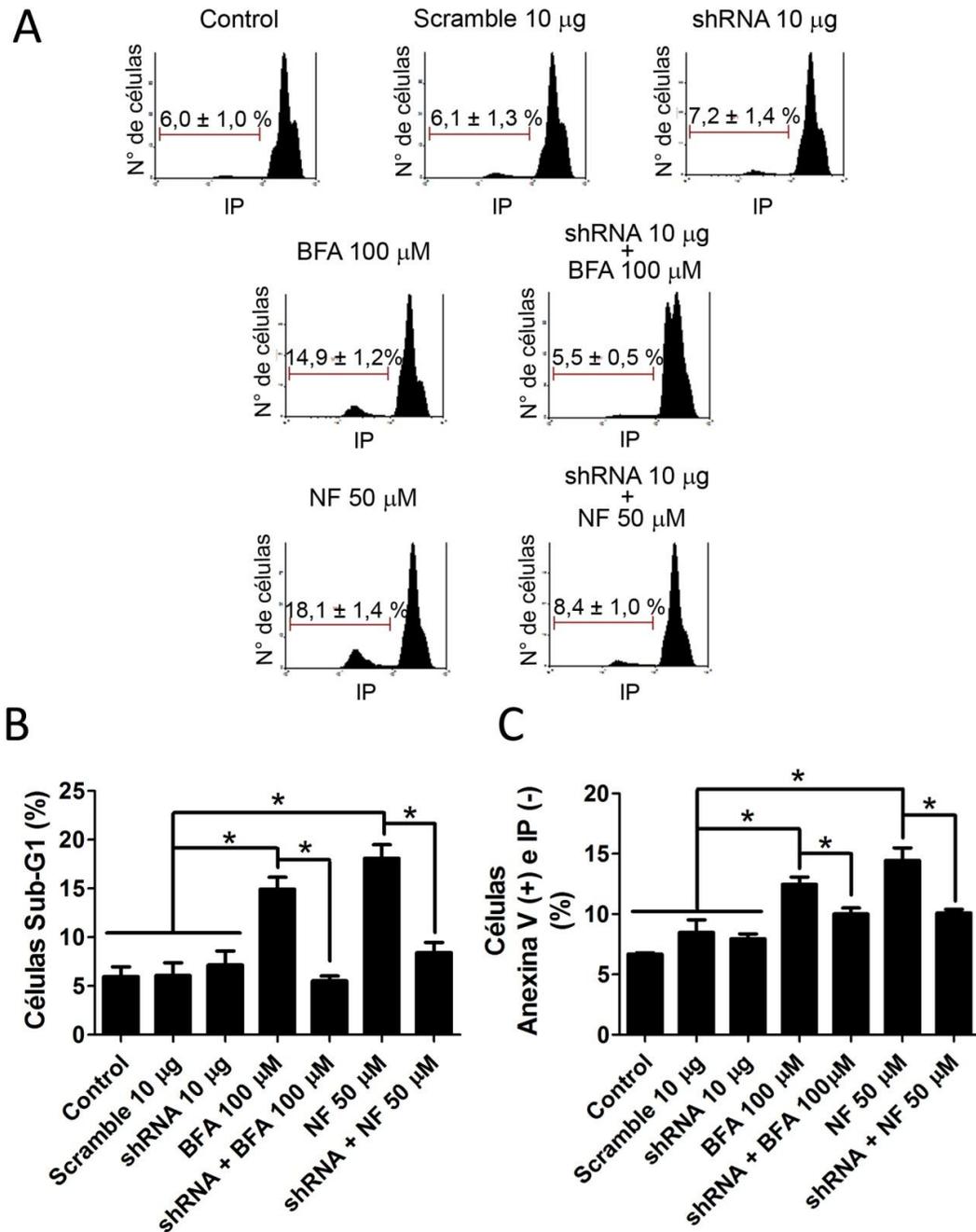


**Figura 41: ADAM17 participa en la apoptosis inducida por BFA y NF en las células TM4.**

24 horas de tratamiento con BFA o NF 0,05 µM induce un incremento del porcentaje de la población de células sub-G1 (A y B) y del porcentaje de células Anexina V positivas e IP negativas (C) determinado por citometría de flujo, lo cual fue prevenido al usar un shRNA en contra del mensajero de la ADAM17 en las células TM4. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media ± SEM, n=3. \* p<0,05.

Lo mismo fue observado en las células LnCap, ya que un tratamiento de 100  $\mu\text{M}$  de BFA o 100  $\mu\text{M}$  de NF indujo un aumento de 2,4 y 3 veces en el porcentaje de células sub-G1, respectivamente, lo cual disminuyó en un 63% y en un 54%, respectivamente, al transfectar previamente las células con un shRNA en contra de la ADAM17 (Fig. 42A y B). Cuando se evaluó el porcentaje de células Anexina V positivas e IP negativas, se observó un aumento de 1,5 y 1,7 veces en el porcentaje de estas células cuando son tratadas por 24 horas con BFA o NF 0,05  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Este aumento disminuyó en un 20% en células tratadas con BFA y en un 30% en células tratadas con NF al transfectar previamente las células con un shRNA en contra de la ADAM17 (Fig. 42C).

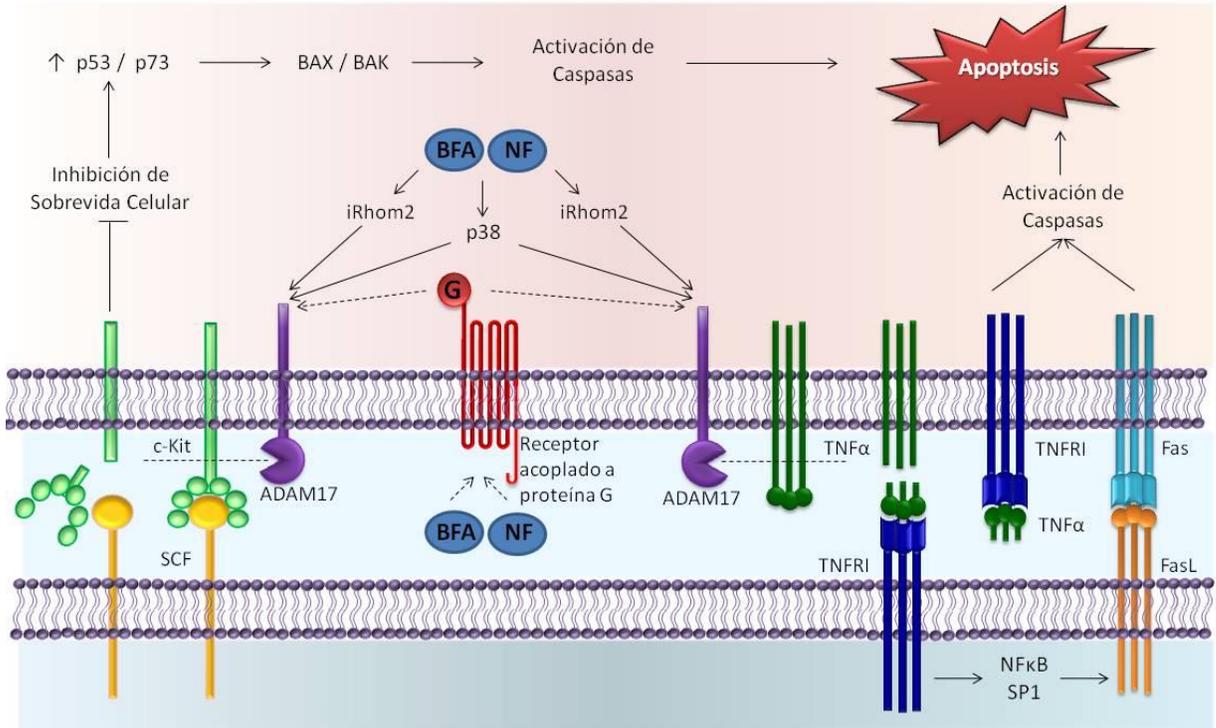
Estos resultados sugieren fuertemente que la ADAM17 participa en la apoptosis *in vitro* inducida por BFA y NF en las células TM4 y LnCap.



**Figura 42: ADAM17 participa en la apoptosis inducida por BFA y NF en las células LnCap.**

6 horas de tratamiento con BFA 100  $\mu\text{M}$  o NF 50  $\mu\text{M}$  induce un incremento del porcentaje de la población de células sub-G1 (A y B) y del porcentaje de células Anexina V positivas e IP negativas (C) determinado por citometría de flujo, lo cual fue prevenido al usar un shRNA en contra del mensajero de la ADAM17 en las células LnCap. Análisis de ANOVA como test primario y análisis de Tukey como test secundario. Media  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \*  $p<0,05$ .

En conjunto, los resultados de esta tesis, permiten postular el siguiente modelo de acción de BFA y NF en la inducción de la apoptosis mediante la ADAM17 (Fig. 43).



**Figura 43: Modelo de acción de BFA y NF en la inducción de apoptosis.**

BFA y NF inducen apoptosis a través de un mecanismo que involucra a la ADAM17. La activación de la ADAM17 puede ser a través de la quinasa p38, la cual se sabe que al inhibirla disminuye los niveles de la ADAM17 en la superficie celular, y la muerte de células germinales inducida por BFA y NF. ADAM17 también puede ser activada por transactivación de receptores acoplados a proteína G. Por otro lado, se requiere de la presencia de iRhom2 para la activación de la ADAM17 inducida por BFA y NF. La activación de la ADAM17 podría gatillar el desprendimiento de receptores supervivencia, como c-kit, inhibiendo así la supervivencia celular, incrementando los niveles de p53 y p73, induciendo a un aumento de las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK, activándose la vía intrínseca de la apoptosis. Por otro lado, la ADAM17 podría gatillar el desprendimiento de TNF $\alpha$ , el cual al unirse a su receptor, TNFRI, induce la activación de la vía extrínseca de la apoptosis y también puede inducir la expresión del ligando FASL, el cual al unirse a su receptor FAS también se activa la vía extrínseca de la apoptosis.

## DISCUSIÓN

### **La ausencia de la ADAM17 en células germinales masculinas meióticas y post-meióticas provoca alteraciones histológicas en la espermatogénesis y desregulación de hormonas reproductivas**

Durante la espermatogénesis hay una compleja interacción entre los diferentes tipos de células, en donde la señalización para/juxtacrina juega un papel fundamental (Cheng et al., 2010). Las proteínas ADAM modulan la interacción célula-célula o célula-matriz, a través de la regulación del desprendimiento de ligandos como factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de adhesión y receptores (Blobel, 2005). Estas proteínas están ampliamente distribuidas a lo largo de diferentes tejidos, y el patrón de expresión y función de las isoformas son reguladas durante el desarrollo, la diferenciación celular y en condiciones patológicas. En el tracto reproductor masculino, las ADAMs se expresan diferencialmente en los testículos, el epidídimo, los conductos deferentes y la próstata, sugiriendo que su función es regulada de acuerdo a los requisitos de cada órgano (Moreno et al., 2011a). Además, nosotros previamente mostramos que la ADAM17 se expresa y se localiza en la membrana celular (lo que es concomitante a su activación) diferencialmente en las células germinales durante la espermatogénesis de rata, lo que sugiere que la ADAM17 pareciera ser activada en períodos específicos de la espermatogénesis (Urriola-Munoz et al., 2014b).

Para conocer cuál es el rol de la ADAM17 en el desarrollo de la espermatogénesis, se creó un ratón *knock out* condicional para las células germinales meióticas y post-meióticas (AD17KO-GC) (Fig. 1, 2, 3, 4 y 5), en los cuales se observa una disminución del peso relativo del testículo a los 21 y 60 días de edad comparado con los ratones *wild type* (Fig. 6). Esa disminución puede ser explicada por una reducción del número de células germinales dentro del epitelio del túbulo seminífero, la cual se ve reflejada en una disminución de la altura de este epitelio, del lumen y del diámetro del túbulo seminífero en los ratones AD17KO-GC (Fig. 7 y 8). Estudios previos han reportado una disminución del tamaño del testículo, del número de células germinales y del diámetro del túbulo seminífero en ratones *knock out* que pierden el receptor de andrógeno tanto ubicuamente (ARKO) como específicamente en las células de Sertoli (SCARKO) a los 20 y 60 días de edad (Chang et al., 2004; De Gendt et al., 2004; O'Shaughnessy et al., 2012), y además se ha reportado una disminución de la masa testicular y del diámetro del túbulo seminífero cuando a ratones de 20 días de edad se le administra 100 µg de estradiol por 15 días (Pak et al., 2003). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en los ratones AD17KO-GC, ya que como se mencionó anteriormente, se observa una disminución del peso relativo del testículo y de los parámetros histológicos del epitelio seminífero (Fig. 6, 7 y 8) y, además se observa una disminución y un incremento en los niveles séricos de testosterona y estradiol, respectivamente, en los ratones AD17KO-GC comparado con los ratones *wild type* (Fig. 9). Cabe destacar, que en los ratones heterocigotos, sólo se observa una disminución del peso relativo del testículo y de los parámetros histológicos del epitelio seminífero a los 60 días de edad, y no a los 21 como en los ratones que pierden en ambos alelos la *adam17* (Fig. 6, 7 y 8). Esto puede deberse a que la ausencia de la ADAM17 en las células germinales provoca un daño acumulativo en el tiempo, en donde la

ausencia de un solo alelo de la *adam17* no provoca alteraciones en los ratones prepúberes, pero sí en los adultos.

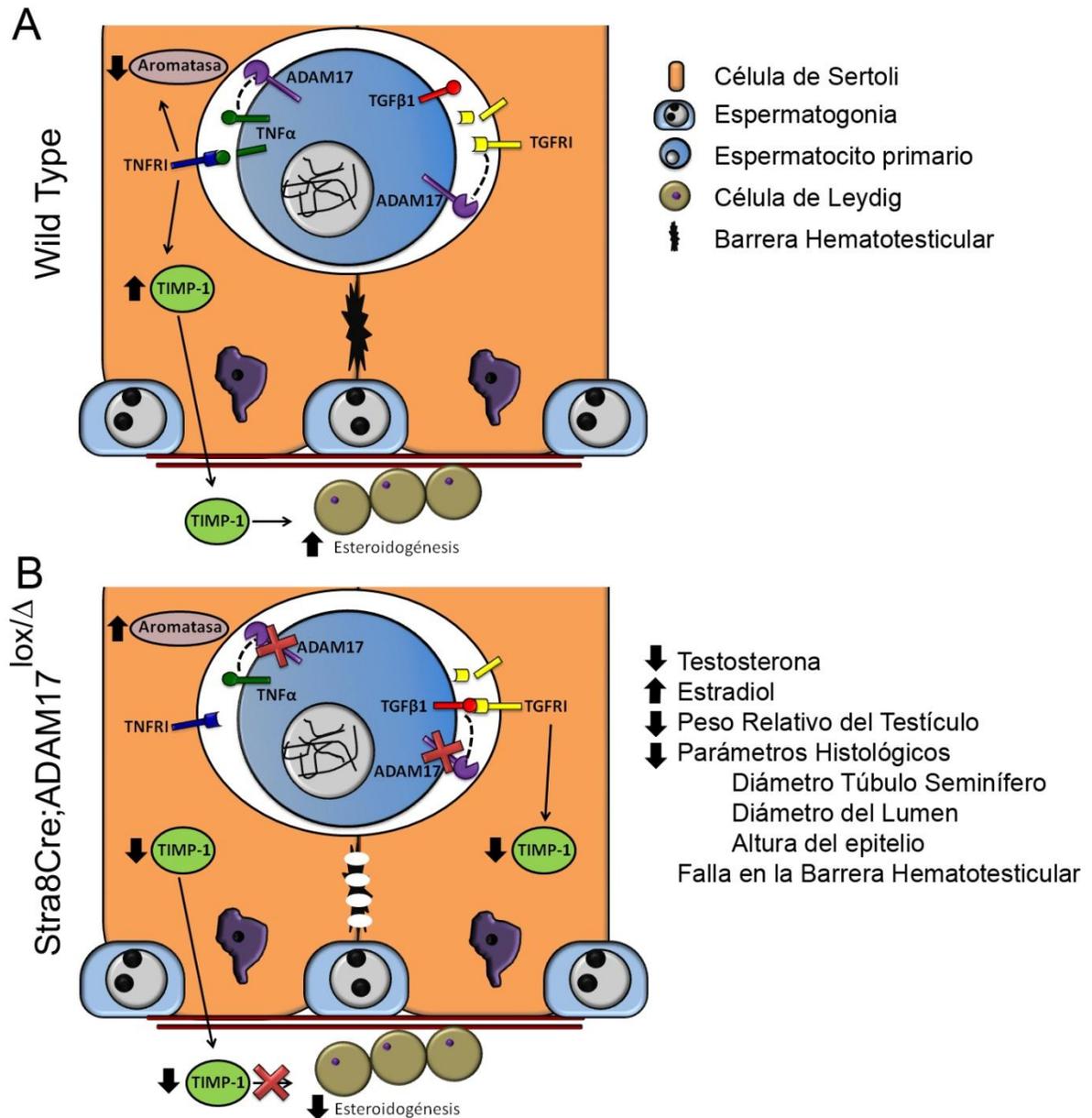
Por otro lado, en los ratones AD17KO-GC se observó vacuolización en la base del epitelio seminífero y alteraciones en la localización de los tipos de células germinales (Fig. 7). En relación a esto, estudios previos han mostrado la participación de andrógenos y estrógenos en la regulación de la barrera hematotesticular (Meng et al., 2005; Pan et al., 2008; Willems et al., 2010). La barrera hematotesticular es una estructura organizada y dinámica conformada por proteínas de uniones estrecha (tales como ocludinas, claudinas, etc.), proteínas de anclaje (como N-caderina) y proteínas gap (como conexina 43), las cuales dividen al túbulo seminífero en dos compartimentos: 1) el basal en donde se encuentran las espermatogonias, y, 2) el abuminal en donde hay un microambiente específico para las células meióticas y post-meióticas (Wong and Cheng, 2005). Se observa una falla en la estructura de la barrera hematotesticular en ratas tratadas con estradiol (Pan et al., 2008), mientras que ratones SCARKO muestran una falla en la formación de la barrera hematotesticular, observándose en los cortes transversales de algunos túbulos seminíferos una especie de vacuolización en la base del epitelio seminífero (Willems et al., 2010) al igual que en los ratones AD17KO-GC (Fig. 7). La testosterona actúa a través de su receptor expresado en las células de Sertoli, regulando la expresión de proteínas que forman la barrera hematotesticular (Meng et al., 2005), por lo que se sugiere fuertemente, que aquella vacuolización observada en los ratones AD17KO-GC podría corresponder a una falla en la formación de la barrera hematotesticular, por una desregulación en la expresión de proteínas que forman la barrera, como consecuencia de una disminución y un aumento de los niveles séricos de testosterona y estradiol, respectivamente.

Hasta el momento se sugiere que la disminución del peso testicular, del número de células en el epitelio seminífero, la altura del epitelio seminífero y el diámetro de este, junto con la vacuolización observada en la base del túbulo seminífero (posible falla en la formación de la barrera hematotesticular) de los ratones AD17KO-GC, se debe a los cambios en los niveles séricos observados de testosterona y estradiol. Sin embargo, faltaría explicar por qué en aquellos ratones que no poseen la ADAM17 en las células germinales meióticas y post-meióticas se observa un desbalance endocrino. Respecto a esto, estudios han mostrado que cuando membranas sinoviales disecadas provenientes de articulaciones de rodilla de rata son tratadas con TNF $\alpha$  o TGF $\beta$ 1 se observa un aumento o una disminución en los niveles del mensajero de TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1), respectivamente (Hyc et al., 2011). Además, se sabe que TNF $\alpha$  induce secreción de TIMP-1 en la línea celular 3T3-L1 provenientes de adipocitos de ratón (Kralisch et al., 2005). Interesantemente, el año 1995 el grupo de investigación de Papadopoulos mostró que las células de Sertoli, *in vitro*, secretan un factor, de 80 kDa correspondiente a un complejo entre TIMP-1 y procatepsina L, que estimula la esteroidogénesis en las células de Leydig (Boujrad et al., 1995). Por lo tanto, se sugiere que en los ratones AD17KO-GC habría un déficit en la liberación de TNF $\alpha$  inducido por la ADAM17, lo que impediría la activación del receptor TNFR1 ubicado en las células de Sertoli (Mauduit et al., 1996), y por otro lado, habría un aumento de la vía de señalización de TGF $\beta$ 1 debido a que en estos ratones hay un déficit del desprendimiento del receptor de TGF $\beta$ 1, ubicado en las células de Sertoli el cual también es sustrato de la ADAM17 (Le Magueresse-Battistoni et al., 1995; Liu et al., 2009). Por lo tanto, en estos ratones habría una disminución de la secreción de TIMP-1 desde las células de Sertoli, lo que provocaría una consecuente reducción de la esteroidogénesis en las células de Leydig, lo que explicaría la disminución de

los niveles séricos de testosterona en estos ratones comparado con los ratones silvestres (Fig. 9A y Fig. 44). De todas formas, como proyección de este trabajo, sería interesante medir los niveles de TIMP-1 en los ratones AD17KO-GG para corroborar esta hipótesis.

Por otro lado, se ha descrito que  $TNF\alpha$  disminuye la actividad de la aromatasa, enzima que produce estradiol a partir de testosterona, inducida por FSH en las células de Sertoli (Mauduit et al., 1993). Por lo tanto, se sugiere que en los ratones AD17KO-GC hay un aumento de la actividad de la aromatasa en las células de Sertoli debido a la disminución de  $TNF\alpha$ , lo que explicaría el aumento de los niveles séricos de estradiol observado en estos ratones comparado con los ratones *wild type* (Fig. 9B y 43). También, como proyección de este trabajo, se sugiere medir la actividad de la aromatasa en las células de Sertoli para corroborar esta hipótesis.

Está ampliamente estudiado que el desarrollo de la espermatogénesis está altamente regulado por señales para/yuxtacrina, autocrinas y endocrinas (Herme et al., 2010), y que existe una compleja comunicación entre todos los tipos celulares ubicados en el testículo (Gnessi et al., 1997). En esta tesis se mostró por primera vez que la ADAM17 de las células germinales meióticas y post-meióticas, a través de las células de Sertoli, podría tener incidencia en la regulación de la producción de testosterona por las células de Leydig y de estradiol por las células de Sertoli.



**Figura 44: Esquema representativo de la interacción entre célula germinal y célula de Sertoli mediada por la ADAM17.**

Esquema de interacción célula germinal-Sertoli-Leydig en ratón *wild type* (A) y en ratón Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> (B). En el ratón *wild type* (A) TNF $\alpha$  es liberado desde la célula germinal mediante la ADAM17, el cual al unirse a su receptor TNFR1, ubicado en la célula de Sertoli, disminuye la actividad aromatasas y aumenta la expresión y liberación de TIMP-1. Por otro lado, la ADAM17 desprende el dominio extracelular del receptor TGFRI de la célula de Sertoli, reduciendo la señalización de TGF $\beta$  en disminuir la expresión de TIMP-1. Las células de Leydig en presencia de TIMP-1 aumentan la esteroidogénesis. En el ratón Stra8Cre;ADAM17<sup>lox/Δ</sup> (B) en ausencia de ADAM17 disminuye la liberación de TNF $\alpha$  desde la célula germinal, disminuyendo así la señalización por su receptor TNFR1. Como

consecuencia, disminuye la inhibición de la aromatasa, aumentando los niveles de estradiol, y también disminuye la expresión y liberación de TIMP-1 desde la célula de Sertoli. Además, en ausencia de la ADAM17, el receptor TGFRI no es desprendido de la célula de Sertoli, por lo que al ser unido a su ligando TGF $\beta$ 1 disminuye la expresión de TIMP-1 en la célula de Sertoli. Como consecuencia, disminuye la esteroidogénesis en las células de Leydig inducido por TIMP-1, disminuyendo los niveles de testosterona. Este desbalance endocrino produce una disminución del peso relativo del testículo, una disminución en los parámetros histológicos (Diámetro de túbulo seminífero, diámetro del lumen del túbulo seminífero y altura del epitelio seminífero), y una falla en la barrera hematotesticular.

## **La ablación de la ADAM17 en células germinales masculinas meióticas y post-meióticas previene la apoptosis fisiológica en células germinales**

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la ADAM17 se localiza en las células germinales apoptóticas, y que dos inhibidores farmacológicos de la ADAM17, GW280264X (Ludwig et al., 2005) y TAPI-0 (Mullberg et al., 1995), previenen la apoptosis de células germinales (Lizama et al., 2010), sin embargo hasta el momento no se sabía si la presencia de la ADAM17 en las células germinales masculinas es fundamental en la apoptosis de estas células. Este es el primer trabajo que muestra que la ablación genética de la ADAM17, mediante la utilización de un ratón *knock out* condicional para la ADAM17 en las células germinales meióticas y post-meióticas disminuye la apoptosis de células germinales *in vivo* (Fig. 10 y 11).

El mecanismo por el cual la ADAM17 disminuye la apoptosis de células germinales masculinas no se ha sido dilucidado, sin embargo estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que las células germinales apoptóticas pierden el dominio extracelular del receptor c-kit, proceso en el cual participa la ADAM17 (Lizama et al., 2010). Previamente se ha mostrado que la inhibición farmacológica de la vía de señalización de sobrevida mediada por el receptor c-kit induce apoptosis (Levy et al., 2009). Además, datos previos indican que en células de mastocitos que tienen la ADAM17 catalíticamente inactiva y por lo tanto disminuye el desprendimiento constitutivo de sus sustrato, hay un incremento de la expresión en la superficie celular del receptor c-kit, junto con una disminución de la apoptosis comparado con mastocitos *wild type* (Cruz et al., 2004). Por lo tanto, esto podría explicar el hecho de que en

los ratones AD17KO-GC se observe una disminución de la apoptosis de células germinales, debido a que la inhibición y/o disminución del desprendimiento del dominio extracelular del receptor c-kit permite la activación de la vía de supervivencia celular inducida por c-kit bajo condiciones fisiológicas. Entonces, el desprendimiento del dominio extracelular del receptor c-kit mediado por la ADAM17 es uno de los elementos desencadenantes de la apoptosis fisiológica de células germinales masculinas durante la primera onda de la espermatogénesis (Fig. 44).

Por otro lado, la señal juxta/paracrina Fas/FasL está presente en el testículo. Fas ha sido localizado en las células germinales, mientras que su ligando FasL es expresado por las células de Sertoli, siendo esta una de las vías reguladoras de la apoptosis de células germinales masculinas (Lee et al., 1997). Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la apoptosis de espermatoцитos durante la primera onda de la espermatogénesis está asociado con una sobreexpresión del receptor Fas y activación de las caspasas-8, -9, -3, -6 y -2, activándose tanto la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis (Lizama et al., 2007; Codelia et al., 2008). Además, se ha mostrado que las células de Sertoli expresan el receptor TNFR1, mientras que las células germinales liberan TNF $\alpha$  después de un daño celular, y la activación del receptor TNFR1 en las células de Sertoli induce la expresión de FasL a través de la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y Sp-1 (Yao et al., 2007). Por lo tanto, esto sugiere que la disminución de la apoptosis de células germinales masculinas observada en los ratones AD17KO-GC se debe a la disminución del desprendimiento de TNF $\alpha$  mediado por la ADAM17, lo que impide la activación de TNFR1 en la célula de Sertoli y la consiguiente

sobreexpresión de FasL, y activación de las vías inductoras de apoptosis mediada por el receptor Fas (Fig. 44).

En resumen, la ausencia de la ADAM17 en las células germinales meióticas y post-meióticas impiden el desprendimiento del receptor c-kit y de la citoquina TNF $\alpha$ , y por lo tanto, por un lado permite la activación de la vía de supervivencia mediada por el receptor c-kit, mientras que por otro lado impide la activación de la vía de apoptosis mediada por Fas/FasL. Teniendo como resultado una disminución de la apoptosis de células germinales masculinas.

Cabe destacar que no se previene completamente la apoptosis de células germinales en los ratones AD17KO-GC (Fig. 10 y 11), esto podría ser explicado porque la ADAM17 expresada en otro tipo celular, como las células de Sertoli, participe en la apoptosis de las células germinales. Por otro lado, en esta tesis se mostró que la ADAM10 desprende sustratos de la ADAM17 en ausencia de esta *in vitro* (Fig. 33 y 37, ver discusión más adelante), al igual que en un trabajo previo, en que cuando se inhibe crónicamente a la ADAM17 es la ADAM10 la que desprende TGF $\alpha$  en presencia de un ionóforo de calcio como ionomicina en las células mEFs (Le Gall et al., 2009). Por otro lado, previamente nuestro laboratorio mostró que la inhibición farmacológica por 24 horas de la ADAM10 no disminuye la apoptosis de células germinales de rata (Lizama et al., 2010). Sin embargo, en base a que la ADAM10 compensa la falta de la ADAM17 sólo cuando esta se inhibe crónicamente y no de forma aguda, se sugiere que en los ratones AD17KO-GC, en donde la ADAM17 está ausente de forma crónica en las células germinales meióticas y post-meióticas, es la ADAM10 quien podría participar en la apoptosis de células germinales. Esta sería una primera aproximación *in vivo* que muestra que

en ausencia de la ADAM17 podría ser la ADAM10 la que participa en la apoptosis de células germinales como un mecanismo compensatorio. Para responder a esta hipótesis, sería interesante crear un ratón doble *knock out* para la ADAM10 y la ADAM17 en las células germinales masculinas y determinar la apoptosis en estas células. Finalmente, otra posible explicación del porqué se observa apoptosis de células germinales en los ratones AD17KO-GC puede deberse a una compensación con la activación de otra vía de apoptosis, como ocurre por ejemplo en los ratones en donde se deleciona el ligando TRAIL (Tumor Necrosis Factor Apoptosis Inducing Ligand), ligando que al unirse a su receptor TRAIL-R activa la vía extrínseca de la apoptosis (Kuang et al., 2000), ya que se observa una compensación por activación de la vía extrínseca de la apoptosis mediada por el receptor FAS, induciéndose así la apoptosis de células germinales en estos ratones (Lin and Richburg, 2014).

Debido a que hay una disminución de la apoptosis de células germinales masculinas en los ratones AD17KO-GC, se esperaba algún problema de fertilidad en estos ratones al igual que lo observado en los ratones donde se delecionan los genes anti-apoptóticos o se sobreexpresan los genes pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, ya que estos ratones son infértiles por un por un arresto de la espermatogénesis en el comienzo de la meiosis, (Knudson et al., 1995; Yamamoto et al., 2001; Russell et al., 2002; Yan et al., 2003; Coultas et al., 2005). Esta infertilidad puede ser explicada por una falla en eliminar aquellas células germinales producidas en exceso y que no pueden ser sustentadas por la célula de Sertoli, ya que se sabe que el número de espermátidas en ratas adultas depende del número de células de Sertoli producidas durante el desarrollo perinatal (Orth et al., 1988), y además que la apoptosis de células germinales en la primera onda de espermatogénesis es necesaria para el desarrollo

funcional de la espermatogénesis (Rodriguez et al., 1997). En resumen, debe existir un balance entre el número de células germinales y células de Sertoli para el correcto desarrollo de la espermatogénesis. En relación a esto, a diferencia de lo esperado los ratones AD17KO-GC son fértiles y además tienen en promedio el mismo número de crías por camada que los ratones *wild type*, sin embargo se observó una disminución del número de espermatozoides en el epidídimo de ratones de 120 días de edad AD17KO-GC comparado con los *wild type* (Fig. 12).

La disminución del número de espermatozoides en el epidídimo observado en los ratones AD17KO-GC puede deberse a que en vista de que hay una disminución de los niveles séricos de testosterona (Fig. 9), hormona esencial para el desarrollo de la espermatogénesis, debido a su participación en la inducción de la meiosis y la subsecuente diferenciación de espermátidas (McLachlan et al., 2002; De Gendt et al., 2004), hay una disminución en el número de células germinales que entran al proceso de meiosis, y por ende disminuye el número de espermatozoides en el epidídimo. Estos ratones además presentan una disminución del peso testicular y de los parámetros histológicos (Fig. 6 y 8) que soportan la hipótesis de que hay menos células en el proceso de la espermatogénesis. Para corroborar esta hipótesis sería interesante estudiar los marcadores de proliferación que hay en los ratones AD17KO-GC, para determinar si hay menos células que están entrando en meiosis en estos ratones. Por otro lado, se sugiere que en los ratones AD17KO-GC hay una falla en la formación de la barrera hematotesticular (Fig. 7), por lo que en el compartimiento adluminal del túbulo seminífero no habría un microambiente necesario para el correcto desarrollo de la

espermatogénesis, lo que se puede traducir en un menor número de espermatozoides producidos.

Una posible explicación de porqué a pesar de encontrar daños histológicos, desregulación de los niveles hormonales y disminución de la concentración de espermatozoides en el ratón AD17KO-GC, éstos son fértiles, puede ser explicado porque no hay diferencia en el porcentaje de RA espontánea (Fig. 13A), que nos indica la integridad del acrosoma en un estado basal (Rufas et al., 1998; Marti et al., 2000), o en el porcentaje de RA inducida por P4 (Fig. 13B), la cual refleja la capacidad del espermatozoide de responder a inductores fisiológicos que se encuentran en el tracto genital femenino que determina su competencia para fecundar al ovocito (Kirkman-Brown et al., 2002; Arienti et al., 2010; Jin et al., 2011).

En conclusión la ausencia de la ADAM17 en células germinales masculinas meióticas y post-meióticas disminuye la apoptosis fisiológicas de estas células, sin embargo, no se observan problemas de fertilidad o disminución del número de crías por camada en estos ratones a pesar de disminuir el conteo de espermatozoides en el epidídimo.

## **La ADAM17 participa en la apoptosis inducida por los xenoestrógenos Bisfenol A y 4-Nonilfenol**

Está ampliamente descrito que BFA y NF generan una disrupción en la espermatogénesis en animales de estudio (Lagos-Cabre and Moreno, 2012). Por ejemplo, se ha observado un aumento de células caspasa-3 activa y TUNEL positiva por túbulo seminífero cuando ratones de 31 días de edad fueron tratados con 480 mg/kg/día de BFA durante 14 días (Li et al., 2009). Por otro lado, se observó un aumento de células TUNEL positivas por túbulo seminífero, cuando ratas de 20 días de edad son tratadas con 125 mg/kg/día de NF durante 60 días (Han et al., 2004). Además, cuando ratas de 7 días de preñez fueron tratadas con 100 mg/kg/día de NF durante toda la gestación, lactancia y luego las crías, hasta que estas tuvieran 10 semanas de edad, se observó en los machos un aumento de células TUNEL y caspasa-3 activa positivas en los túbulos seminíferos (McClusky et al., 2007). Por último, un trabajo reciente de nuestro laboratorio mostró que una sola dosis de 50 mg/kg de BFA o NF aumenta el número de células Sub-G1, de células picnóticas, caspasa-3 activa y TUNEL por túbulo seminífero (Urriola-Munoz et al., 2014a) en ratas de 21 días tratadas por 24 horas. Sin embargo, en esta tesis se muestra que una tratamiento de 24 horas con una dosis única de 1 mg/kg de BFA o NF, menor a la utilizada en los trabajos anteriormente descritos y menor a la dosis NOAEL (No Observed Adverse Effect Level, por sus siglas en inglés) correspondiente a 5 mg/kg/día para BFA (WHO, 2010b) y 15 mg/kg/día para NF (WHO, 2002), induce un aumento de células germinales apoptóticas, determinado por el aumento del número de células picnóticas por túbulo seminífero (Fig. 14 y 15), el número de células caspasa-3 activa positiva por túbulo seminífero (Fig. 16) y por el número de células TUNEL positivas por túbulo seminífero (Fig.

17) en los ratones de 21 días de edad *wild type*. BFA y NF induce apoptosis de células germinales, pero no de las células de Sertoli *in vivo*. Sin embargo, en esta tesis también se mostró que, *in vitro*, BFA y NF inducen apoptosis en la línea celular TM4, proveniente de células de Sertoli (Fig. 40, 41 y 42), corroborando así resultados descritos previamente (Gong et al., 2009; Choi et al., 2014; Qian et al., 2014), por lo que esta diferencia puede deberse porque bajo condiciones *in vitro* las células de Sertoli pueden estar más propensas a los estímulos de muerte en comparación a condiciones *in vivo*, debido a que ellas tienen señales de supervivencia en su contexto de comunicación intercelular que las protegen de la apoptosis.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que la ADAM17 participa en la apoptosis de células germinales y de líneas celulares provenientes de espermatogonias y espermatocitos (GC-1 y GC-2) inducida por la droga anticancerígena etoposide, la cual es un inhibidor de la topoisomerasa II que induce daño al DNA (Lizama et al., 2011; Lizama et al., 2012). También han mostrado que la mayoría de las células apoptóticas son células germinales positivas para la ADAM17, y que la ADAM17 participa en la apoptosis de células germinales inducida por los xenoestrógenos BFA y NF, debido a que en una aproximación *in vivo* se mostró que un inhibidor farmacológico de la ADAM17, GW280264X, previno la apoptosis inducida por un tratamiento de 24 horas de una única dosis de 50 mg/kg de BFA o NF (Urriola-Munoz et al., 2014a).

Debido a que en los trabajos previos se utilizó un inhibidor farmacológico, el cual se inyectó intratesticularmente, y al asumir una distribución homogénea, no se sabe cuál ADAM17 es la que participa en la apoptosis de células germinales, es decir, la ADAM17 de

las mismas células germinales o la de las células de Sertoli, ya que previamente nosotros mostramos que la ADAM17 se expresa en ambos tipos celulares (Urriola-Munoz et al., 2014b). Por esta razón, en esta tesis se extendieron los resultados obtenidos por el laboratorio anteriormente y se logró determinar por primera vez que es la ADAM17 de las células germinales meióticas y post-meióticas la que participa en la apoptosis inducida de células germinales. Debido a que el aumento de la apoptosis de células germinales inducido por un tratamiento de 24 horas con una dosis única de 1 mg/kg de BFA o NF disminuye aproximadamente a la mitad en los ratones heterocigotos y disminuye llegando a niveles basales en los AD17KO-GC de 21 días de edad (Fig. 15, 16 y 17). Por lo tanto, la ausencia de un alelo de la *adam17* en las células germinales meióticas y post-meióticas es suficiente para prevenir la apoptosis de células germinales inducida por 1mg/Kg de BFA o NF en ratones de 21 días de edad. Mientras que la total ausencia de ADAM17 en las células germinales post-meióticas previene completamente la apoptosis inducida por los xenoestrógenos BFA y NF, sugiriendo que la disminución de la apoptosis de células germinales pareciera ser dosis genética dependiente de la ADAM17.

Por otro lado, en esta tesis también se mostró que la participación de la ADAM17 en la apoptosis inducida por BFA y NF no queda restringida sólo a células germinales o líneas celulares derivada de estas, debido a que se mostró que tanto BFA como NF inducen apoptosis de la línea celular TM4, proveniente de células de Sertoli de ratón, y la línea celular LnCap, proveniente de carcinoma de próstata humana, determinada por el aumento de los niveles del fragmento de 86 kDa de PARP por *western blot* (Fig. 40), y determinada por el aumento del porcentaje de células sub-G1 y del porcentaje de células Anexina V positivas e yoduro de

propidio (IP) negativas por citometría de flujo (Fig. 41 y 42). La apoptosis inducida por BFA y NF es prevenida al utilizar un shRNA en contra del mensajero de la ADAM17 (Fig. 40, 41 y 42), sugiriendo que la ADAM17 no participa sólo en la apoptosis de células germinales, sino que también de otros tipos celulares como lo son las células de Sertoli y de próstata.

Además, es importante destacar que BFA y NF inducen apoptosis a concentraciones similares a las encontradas en muestras de sangre de humano expuesto a concentraciones diarias normales de xenoestrógenos (Ikezuki et al., 2002; Kawaguchi et al., 2004) al utilizar la línea celular TM4. A pesar de que las concentraciones utilizadas en la línea celular LnCap son mayores a las utilizadas con las TM4, estas concentraciones harían analogía con los humanos expuestos diariamente a altas concentraciones de estos xenoestrógenos, por ejemplo trabajadores de fábricas de plásticos, pinturas, etc., debido a que en ellos se ha encontrado hasta 500 veces más BFA en la orina comparado con personas no expuestas (Li et al., 2010). Por otro lado, es posible que se requiera una mayor concentración de BFA o NF para inducir apoptosis en las células LnCap debido a que estas provienen de cáncer de próstata, y es sabido que las células cancerígenas son más resistentes que las células normales a tóxicos que inducen la muerte, como por ejemplo, a drogas anticancerígenas.

Tal como se indicó anteriormente, el mecanismo por el cual la ADAM17 participa en la apoptosis inducida por BFA y NF aún no es conocido, pero es válido pesar que la ausencia de la ADAM17 impide el desprendimiento del dominio extracelular del receptor de sobrevivencia c-kit, debido a que previamente se ha mostrado que PMA, un conocido inductor de la actividad de la ADAM17, induce un aumento de células germinales que pierden el dominio

extracelular de c-kit, las que además son apoptóticas, lo que se previene al utilizar un inhibidor farmacológico de la ADAM17 (Lizama et al., 2010) (Fig. 44). También puede ser que la ausencia de la ADAM17 en las células germinales impida el desprendimiento de TNF $\alpha$  y la consiguiente activación de la vía de apoptosis Fas/FasL, en relación a esto, la exposición de ratas macho al tóxico Mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), el cual induce apoptosis de células germinales, resulta en un incremento de la liberación de TNF $\alpha$  desde las células germinales, lo que genera un incremento de la expresión de FasL desde las células de Sertoli (Yao et al., 2007) (Fig. 44).

En conclusión, la ausencia de la ADAM17 en células germinales masculinas meióticas y post-meióticas, y la utilización de shRNA en contra del mensajero de la ADAM17 previene la apoptosis inducida por BFA y NF de las células germinales masculinas y de las líneas celulares TM4 y LnCap.

## **Los xenoestrógenos Bisfenol A y 4-Nonilfenol inducen activación de la ADAM17 dependiente de iRhom2.**

Estudios previos sugieren que la activación de la ADAM17 está asociado con su translocación a la superficie celular, lo que significa que sólo la forma activa de la ADAM17 está localizada en la superficie celular (Peiretti et al., 2003; Killock and Ivetic, 2010). De acuerdo a esto, un trabajo previo de nuestro laboratorio utilizando células aisladas de túbulo seminífero de ratas de 21 días después de un tratamiento con 50 mg/kg de BFA o NF, mostró que el tratamiento induce un aumento del porcentaje de células que tienen ADAM17 en la superficie celular, lo que sugiere una activación de esta enzima (Urriola-Munoz et al., 2014a). En esta tesis se propuso determinar si BFA y NF inducen el desprendimiento de sustratos de la ADAM17, para esto se transfectaron transientemente la línea celular GC-1 proveniente de espermatogonia y espermatoцитos de ratón con el plasmidio (AP)-NRG  $\beta$ 1, el cual expresa una proteína que tiene el dominio intracelular, el de transmembrana y parte del dominio extracelular de neuregulina  $\beta$ 1 (sustrato de la ADAM17), fusionada a FA (Fig. 18). Esta proteína de fusión ha sido utilizada en trabajos previos para evaluar la actividad metaloproteasa de la ADAM17 *in vitro* (Horiuchi et al., 2005).

Se decidió utilizar dos líneas celulares relacionadas con el sistema reproductor masculino, las cuales son las líneas celulares TM4 y LnCap. Ambas líneas celulares presentan las siguientes ventajas para estudiar *in vitro* si BFA o NF inducen actividad de la ADAM17: 1) Ellas expresan endógenamente ADAM17 (Fig. 23) y no expresan de manera endógena neuregulina  $\beta$ 1 (Fig. 24), 2) estudios previos han mostrado que BFA y NF inducen apoptosis

en la línea celular TM4 (Choi et al., 2014; Qian et al., 2014), mientras que BFA induce una disminución de la proliferación celular en la línea LnCap (Wetherill et al., 2005), y 3) se ha mostrado que BFA y NF induce liberación de TNF $\alpha$  desde cultivo primario de células de Sertoli, sugiriendo un rol de la ADAM17 en este proceso (Urriola-Munoz et al., 2014a).

Utilizando ambas líneas celulares se determinó por primera vez que BFA y NF a las mismas concentraciones que inducen apoptosis, también promueven actividad metaloproteasa de la ADAM17, debido a que inducen desprendimiento de neuregulina  $\beta$ 1 (Fig. 26 y 28) con un tratamiento desde 1 hora en las células TM4 o de 3 horas en las células LnCap (Fig. 29), ya sean transfectadas de forma transiente como en el caso de las TM4 o estables como las LnCap. Además, el desprendimiento de neuregulina  $\beta$ 1 inducido por BFA y NF es prevenido al utilizar un shRNA en contra del mensajero de la ADAM17 en las células TM4 y LnCap (Fig. 30 y 31), al igual que el de TNF $\alpha$  en las células LnCap (Fig. 31). Por lo tanto, estos resultados sugieren que BFA y NF son capaces de inducir la activación de la ADAM17.

Por otro lado, BFA y NF inducen el desprendimiento de TGF $\alpha$  y HB-EGF desde las células mEFs (Fig. 32). Utilizando células mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup> se mostró que el desprendimiento de HB-EGF inducido por BFA y NF fue prevenido (Fig. 33C y 34C), así como también se previno el desprendimiento de TGF $\alpha$  inducido por NF (Fig. 34D), tal como se ha descrito anteriormente con el estímulo de PMA (Horiuchi et al., 2007; Le Gall et al., 2009). Sin embargo, el desprendimiento de TGF $\alpha$  inducido por BFA no fue completamente prevenido en las células mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup> (Fig. 33D). Por lo tanto, estos resultados indican que BFA y NF inducen el desprendimiento de HB-EGF, así como NF induce el desprendimiento de TGF $\alpha$  de

una manera dependiente de la ADAM17, al igual que en las células TM4 y LnCap, mientras que el desprendimiento de TGF $\alpha$  inducido por BFA no es dependiente completamente de la ADAM17. Esto podría deberse a que una o más proteasas además de la ADAM17 podrían ser activadas por BFA.

Se identificó a la ADAM10 como la metaloproteasa que desprende TGF $\alpha$  inducido por BFA en las células mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup>, debido a que el desprendimiento de TGF $\alpha$  inducido por BFA fue completamente prevenido en las células mEFs *Adam10/17*<sup>-/-</sup> (Fig. 33F). Se sugiere que BFA podría estar activando a la ADAM10 por desregulación en los niveles intracelulares de calcio, debido a que se sabe que BFA induce una desregulación de la homeostasis de calcio (Lee et al., 2008; Yan et al., 2011) y por resultados no publicados de nuestro laboratorio se sabe que BFA inducen un influjo de calcio en espermatoцитos y espermátidas de ratas de 21 días de edad, y por otro lado se sabe que el influjo de calcio activa a la ADAM10 (Sahin et al., 2004; Le Gall et al., 2009).

Es interesante que en las células TM4 o LnCap al utilizar un shRNA en contra del mensajero de la ADAM17 se previene completamente el desprendimiento del sustrato de la ADAM17 inducido por BFA y NF, sin embargo cuando se utilizan células mEFs *Adam17*<sup>-/-</sup> no se previene completamente el desprendimiento del sustrato de la ADAM17 inducido por BFA. Esta diferencia puede deberse en primer lugar a los diferentes tipos celulares utilizados, debido a que las primeras son líneas celulares, mientras a que las últimas son fibroblastos embrionarios de ratón generados a partir de un ratón *knock out* para la ADAM17. Por otro lado, esta diferencia también puede estar dada a que en los experimentos con las TM4 y

LnCap se inhibe la expresión de la ADAM17 al utilizar un shRNA, es decir, esta inhibición es momentánea, no es una modificación genética, a diferencia de lo ocurrido con las células mEFs *Adam17<sup>-/-</sup>*, ya que al ser una modificación genética estas células nunca han expresado ADAM17. Lo mencionado anteriormente puede influir en que cuando hay una eliminación aguda de la ADAM17, por ejemplo con la utilización de un shRNA, la célula no presenta un compensador, es decir una proteína que cumpla su función en falta de ella, a diferencia de cuando hay una eliminación crónica de la ADAM17, por ejemplo un *knock out*, en donde la célula tiene a la ADAM10 como una proteína compensadora que puede liberar los sustratos de la ADAM17 en ausencia de esta. Este fenómeno de compensación ha sido previamente descrito, debido a que cuando se inhibe crónicamente a la ADAM17 es la ADAM10 la que desprende TGF $\alpha$  en presencia de un ionóforo de calcio como ionomicina en las células mEFs (Le Gall et al., 2009).

Además, estos resultados indican que, *in vitro*, BFA y NF inducen activación de la ADAM17 en células de Sertoli de ratón, en células de cáncer de próstata humana y en fibroblastos embrionarios de ratón, sugiriendo que estas observaciones no están restringidas a un sólo tipo celular ni a una sola una especie. Es más, también se sugiere que BFA, NF y otros xenoestrógenos pueden afectar procesos fisiológicos en humanos, además de la apoptosis de células germinales, ya que estos compuestos al inducir activación de la ADAM17 pueden inducir una liberación de citoquinas pro-inflamatorias (como TNF $\alpha$ ) a nivel sistémico, afectando así el metabolismo general del organismo y aún más en pacientes cuyas enfermedades se caracterizan por un aumento de citoquinas pro-inflamatorias en el organismo,

como lo son la diabetes, el cáncer, etc. (Yao et al., 2009; Rogers et al., 2013; Park and Choi, 2014; Shapiro et al., 2015).

Debido a que BFA y NF inducen un incremento de la actividad de la ADAM17 en tiempos cortos desde 1 hora de estímulo, se quiso determinar si las iRhoms1 y 2, proteínas que han sido recientemente identificadas como un regulador fundamental de la función y selectividad de sustrato de la ADAM17 (Adrain et al., 2012; McIlwain et al., 2012; Siggs et al., 2012; Maretzky et al., 2013; Brooke et al., 2014), son requeridas para el desprendimiento de TGF $\alpha$  y HB-EGF, ambos sustratos de la ADAM17, inducido por los xenoestrógenos BFA y NF.

Nuestros resultados muestran que BFA y NF inducen el desprendimiento de TGF $\alpha$  y HB-EGF de manera independiente de iRhom1 (Fig. 35), tal como se ha mostrado en estudios previos en donde la inactivación de iRhom1 por sí sola no afecta la actividad basal o estimulada de la ADAM17 (Maretzky et al., 2013). Por otro lado, se mostró que la presencia de iRhom2 es esencial para el desprendimiento de HB-EGF, pero no de TGF $\alpha$ , en las células mEFs cuando son tratadas con BFA (Fig. 36A, B, E y F). El hecho que el desprendimiento de HB-EGF dependa de iRhom2 y ADAM17, mientras que el desprendimiento de TGF $\alpha$  no depende de iRhom2 pero sí de ADAM17 había sido mostrado previamente al utilizar PMA como inductor de la actividad de la ADAM17 (Maretzky et al., 2013). Interesantemente el desprendimiento de HB-EGF inducido por NF también fue independiente de iRhom2 (Fig. 36H), a diferencia del estímulo de PMA, en donde el desprendimiento de HB-EGF si requiere la presencia de iRhom2 (Fig. 36H). Estos resultados sugieren que la estimulación con NF

induce desprendimiento de HB-EGF incluso en ausencia de iRhom2, pero no de la ADAM17. Esto puede ser explicado, nuevamente, porque es ADAM10 la que desprende el sustrato de la ADAM17 en ausencia de iRhom2, cabe recordar que las células mEFs *iRhom2*<sup>-/-</sup> no poseen ADAM17 activa en la membrana (Adrain et al., 2012), imposibilitando a la ADAM17 a desprender sus sustratos. Nuestros resultados muestran que en ausencia de ADAM17 o iRhom1/2 es la ADAM10 la que desprende BTC, un sustrato específico de la ADAM10, luego de un estímulo con NF pero no con BFA (Fig. 37). Mientras que en las células mEFs *Adam10/17*<sup>-/-</sup> NF no induce el desprendimiento de BTC (Fig. 37F).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que BFA y NF inducen el desprendimiento de ligandos del EGFR activando diferencialmente la ADAM17 o la ADAM10 dependiendo del contexto celular, sugiriendo que ambos compuestos están activando diferentes cascadas de señalización.

## **Los xenoestrógenos Bisfenol A y 4-Nonilfenol inducen activación de diferentes proteínas quinasa**

En relación a que BFA y NF podrían estar activando diferentes cascadas de señalización, como aproximación se identificó que un tratamiento de 15 min con BFA o NF en las células LnCap induce la fosforilación de cascadas de señalización de receptor acoplado a proteína G y receptores tirosina quinasa como el receptor c-kit o de citoquinas pro-inflamatorias (Fig. 39A y B).

Se sugiere que un tratamiento de 15 min con BFA o NF inducen adhesión y migración celular por la vía de GPCRs/PLC/PKC (McCudden et al., 2005; Al-Jarallah et al., 2014) y de eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase), Akt y AMPK $\alpha$ 2 (AMP-activated protein kinase), las cuales también están relacionadas con adhesión y migración celular (Kimura et al., 2006).

El tratamiento de 15 min con BFA o NF activan vías de crecimiento, diferenciación y supervivencia celular, debido a que se observa fosforilación de las STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), y además BFA induce fosforilación de proteínas de la familia src como Lyn, Lck, Fyn y Yes, de las kinasas Akt, mTOR, c-Jun y del factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding). Está descrito que STAT es fosforilado por las proteínas JAK (Janus Kinase) las que a su vez pueden ser fosforiladas por las proteínas de la familia src, en respuesta a activación de receptores tirosina quinasa, como por ejemplo cuando SCF activa al receptor c-kit, o en respuesta a activación de GPCRs, induciendo así

crecimiento, diferenciación y supervivencia celular (Ryan et al., 1997; Krystal et al., 1998; Brizzi et al., 1999; Silva, 2004; New and Wong, 2007).

Por otro lado, el tratamiento de 15 min con BFA o NF inhiben vías de crecimiento celular debido a que se encuentra activada la proteína PRAS40, la cual es activada por Akt vía receptor tirosina quinasa, y se ha descrito que al unirse PRAS40 con mTOR impide que este último se una a sus sustratos impidiendo la síntesis de proteínas para el crecimiento celular (Sancak et al., 2007; Wang et al., 2007).

Finalmente, un tratamiento de 15 min con BFA induce apoptosis celular debido a que se encuentran fosforiladas las proteínas p38 $\alpha$ , Chk-2 (Check point Kinase 2), APMK $\alpha$ 2 y, las cuales activan p53 induciendo así apoptosis (Sanchez-Prieto et al., 2000; Tichy et al., 2007). Por otro lado, también se observa fosforilación de Hsp27 (Heat Shock Protein 27), proteína que se une y regula la actividad transcripcional de p53 en respuesta a tratamientos con doxorubicina, disminuyendo la toxicidad celular (Venkatakrishnan et al., 2008).

A pesar de que con el tratamiento de BFA se observó que se fosforilan 20 proteínas, mientras que con el NF sólo se fosforilan 4 (Fig. 38), se sugiere que las vías de activación tienen en común debido a que las 4 quinasas fosforiladas observadas con NF son quinasas que se encuentran río abajo de quinasas que no se vieron fosforiladas con NF pero sí con BFA, sugiriendo que posiblemente a los 15 min del tratamiento con NF las quinasas que se encuentran río arriba fueron fosforiladas previamente.

Por otro lado, tal como se dijo anteriormente, con el tratamiento de 15 minutos con BFA se observó la activación de vías de 1) migración y adhesión celular, 2) crecimiento, diferenciación y supervivencia celular, y 3) de apoptosis. Sin embargo el tratamiento de 15 minutos con NF sólo muestra la activación de las dos primeras vías, a pesar de que fue observado que NF induce apoptosis en células germinales masculinas y en las líneas celulares TM4 y LnCap (Fig. 14, 15, 16, 17, 40, 41 y 42). Esto puede ser explicado debido a que la activación de la vía de apoptosis inducida por NF es más lenta que la inducida por BFA, lo cual es corroborado por resultados recientemente publicado de nuestro laboratorio, en donde se muestra *in vivo*, que p38 se fosforila en el testículo a las 2 horas después de la aplicación de una dosis de 50 mg/kg de NF a ratas de 21 días, mientras que el tratamiento con BFA induce la fosforilación de p38 desde los 15 minutos (Urriola-Munoz et al., 2014a).

Aún no se sabe cómo BFA y NF activan a la ADAM17, sin embargo se conocen algunas quinasas que se fosforilan en presencia de estos compuestos. Por un lado, puede ser que BFA y NF se unan a receptores acoplados a proteína G, los cuales se conocen que inducen transactivación de receptores tirosina quinasa mediado por la metaloproteasas de membrana (Prenzel et al., 1999; Eguchi et al., 2001). O también puede ser que se unan a receptores tirosina quinasa en vista a las diferentes proteínas quinasas que se observaron fosforiladas.

Las metaloproteasas de membrana juegan un papel importante en muchos procesos biológicos. La ADAM17 es una metaloproteasa que se encuentra ubicuamente localizada y participa en procesos inflamatorios como el cáncer, la diabetes, la artritis reumatoide, y también en enfermedades como el Alzheimer. Por lo tanto, el haber determinado que la

ADAM17 participa tanto en la apoptosis fisiológica como inducida por BFA y NF de células germinales masculinas, de células de Sertoli (TM4) y de células de cáncer de próstata humano (LnCap), junto con la participación de iRhom2 como una proteína necesaria para la activación de la ADAM17 inducida por BFA y NF, y además observar la activación de vías de migración, adhesión, crecimiento, diferenciación y supervivencia celular en una línea celular LnCap, da luces de cómo dos compuestos que tienen una distribución ubicua en productos plásticos utilizados por el humano diariamente, podrían estar afectando no tan solo la salud reproductiva por inducir apoptosis de células germinales junto con una disminución de la producción de espermatozoides, sino que también, podrían estar afectando enfermedades en donde se ha determinado que la participa ADAM17. En este sentido, los resultados de esta tesis ayudarán a tener un mejor conocimiento sobre el impacto de BFA y NF sobre la salud humana y proveer el desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas para enfermedades reproductivas, inflamatorias, etc.

## CONCLUSIÓN

Gracias a los resultados obtenidos en esta tesis se pudo responder a nuestra hipótesis ya que la ADAM17 participa en la apoptosis de células germinales tanto fisiológica como inducida por los xenoestrógenos BFA y NF durante la espermatogénesis de ratón.

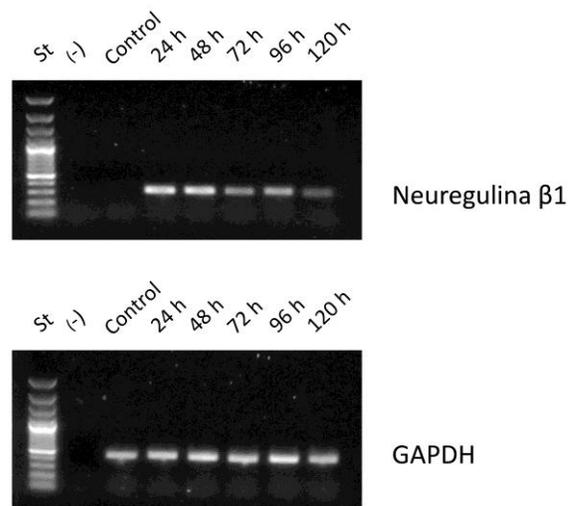
En conjunto, a partir de los datos de esta tesis se desprenden las siguientes conclusiones:

- La ADAM17 participa en la apoptosis fisiológica e inducida por los xenoestrógenos BFA y NF de células germinales masculinas, de células de Sertoli (TM4) y de células de cáncer de próstata humano (LnCap).
- La ausencia de la ADAM17 en las células germinales meióticas y post-meióticas provoca alteraciones histológicas en la espermatogénesis, como la disminución del tamaño testicular, la altura del epitelio seminífero, del diámetro del túbulo seminífero, y del lumen del túbulo seminífero, que puede ser explicado por la desregulación de hormonas reproductiva que genera la ausencia de esta enzima, sugiriendo que la ADAM17 de las células germinales meióticas y post-meióticas regula, de alguna manera, la esteroidogénesis de las células de Leydig.

- La ablación de la ADAM17 en células germinales masculinas meióticas y post-meióticas provoca una disminución de la concentración de espermatozoides en el epidídimo, sin embargo los ratones son fértiles, sin observarse cambios en el número de crías por camada ni en la reacción del acrosoma espontánea o inducida por progesterona.
- Los xenoestrógenos BFA y NF inducen el desprendimiento de diferentes sustratos de la ADAM17, como  $TNF\alpha$ , neuregulina  $\beta 1$ ,  $TGF\alpha$  y HB-EGF, demostrando que inducen activación de la ADAM17.
- iRhom2, pero no iRhom1, participa en el desprendimiento de sustratos de la ADAM17 inducido por los xenoestrógenos BFA y NF.
- Los xenoestrógenos BFA y NF inducen fosforilación de quinasas que participan en las vías de migración y adhesión celular, crecimiento, diferenciación y sobrevivencia celular y apoptosis.

Como conclusión general, los resultados muestran que la ADAM17 de las células germinales meióticas y post-meióticas participa en la apoptosis fisiológica e inducida por los xenoestrógenos Bisfenol A y 4-Nonilfenol de estas células. Y no tan solo en este modelo, sino que la ADAM17 también participa en la apoptosis inducida por BFA y NF en células de Sertoli (TM4) y de células de cáncer de próstata humano (LnCap), mostrando que no es un mecanismo restringido a un solo tipo celular. Además, iRhom2 participa en el

desprendimiento de sustratos de la ADAM17 inducido por BFA y NF, que junto con datos de la literatura se propone un modelo de acción de los xenoestrógenos en células de mamíferos (Fig. 44).

**APÉNDICE A****Apéndice A: Expresión de neuregulina β1 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la transfección en células TM4.**

RT-PCR en la línea celular TM4 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-transfección con el plasmidio (AP)-NRG β1. La línea celular TM4 no expresan de manera endógena el mensajero de neuregulina β1, pero sí luego de 24 horas después de la transfección, la cual disminuye a las 120 horas. GAPDH como control de carga.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abram CL, Seals DF, Pass I, Salinsky D, Maurer L, Roth TM, Courtneidge SA. 2003. The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem* 278:16844-16851.
- Adrain C, Zettl M, Christova Y, Taylor N, Freeman M. 2012. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science* 335:225-228.
- Aitken RJ. 2006. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 29:69-75; discussion 105-108.
- Al-Jarallah A, Chen X, Gonzalez L, Trigatti BL. 2014. High density lipoprotein stimulated migration of macrophages depends on the scavenger receptor class B, type I, PDZK1 and Akt1 and is blocked by sphingosine 1 phosphate receptor antagonists. *PLoS One* 9:e106487.
- Arienti G, Mazzoni M, Spapperi C, Saccardi C, Palmerini CA. 2010. Effect of FSH and progesterone on human spermatozoa cytosolic calcium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120:180-183.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 12:323-330.
- Bieber AM, Marcon L, Hales BF, Robaire B. 2006. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *J Androl* 27:189-200.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.
- Blobel CP. 1997. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* 90:589-592.
- Blobel CP. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:32-43.
- Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356:248-252.
- Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. 1998. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 352:1172-1177.
- Boujrad N, Ogwuegbu SO, Garnier M, Lee CH, Martin BM, Papadopoulos V. 1995. Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science* 268:1609-1612.

- Brizzi MF, Dentelli P, Rosso A, Yarden Y, Pegoraro L. 1999. STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *J Biol Chem* 274:16965-16972.
- Brooke MA, Etheridge SL, Kaplan N, Simpson C, O'Toole EA, Ishida-Yamamoto A, Marches O, Getsios S, Kelsell DP. 2014. iRHOM2-dependent regulation of ADAM17 in cutaneous disease and epidermal barrier function. *Hum Mol Genet* 23:4064-4076.
- Bustamante-Marin X, Quiroga C, Lavandero S, Reyes JG, Moreno RD. 2012. Apoptosis, necrosis and autophagy are influenced by metabolic energy sources in cultured rat spermatocytes. *Apoptosis* 17:539-550.
- Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113:391-395.
- Codelia VA, Cisterna M, Alvarez AR, Moreno RD. 2010. p73 participates in male germ cells apoptosis induced by etoposide. *Mol Hum Reprod* 16:734-742.
- Codelia VA, Cisternas P, Moreno RD. 2008. Relevance of caspase activity during apoptosis in pubertal rat spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 75:881-889.
- Coultas L, Bouillet P, Loveland KL, Meachem S, Perlman H, Adams JM, Strasser A. 2005. Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis. *EMBO J* 24:3963-3973.
- Cousin H, Gaultier A, Bleux C, Darribere T, Alfandari D. 2000. PACSIN2 is a regulator of the metalloprotease/disintegrin ADAM13. *Dev Biol* 227:197-210.
- Cruz AC, Frank BT, Edwards ST, Dazin PF, Peschon JJ, Fang KC. 2004. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme controls surface expression of c-Kit and survival of embryonic stem cell-derived mast cells. *J Biol Chem* 279:5612-5620.
- Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S. 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6876-6881.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17:393-403.
- Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. 1999. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 443:285-289.
- Cheng CY, Wong EW, Yan HH, Mruk DD. 2010. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Mol Cell Endocrinol* 315:49-56.
- Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. 2002. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Arch Toxicol* 76:545-551.
- Choi MS, Park HJ, Oh JH, Lee EH, Park SM, Yoon S. 2014. Nonylphenol-induced apoptotic cell death in mouse TM4 Sertoli cells via the generation of reactive oxygen species and activation of the ERK signaling pathway. *J Appl Toxicol* 34:628-636.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G. 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1327-1332.

- De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ. 2002. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10458-10463.
- Degterev A, Yuan J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:378-390.
- Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Esparis-Ogando A, Yuste L, Pandiella A. 2002. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell* 13:2031-2044.
- Dorion S, Landry J. 2002. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress Chaperones* 7:200-206.
- Du K, Montminy M. 1998. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273:32377-32379.
- Duriez PJ, Shah GM. 1997. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* 75:337-349.
- Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T. 2001. Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem* 276:7957-7962.
- Fan H, Derynck R. 1999. Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *EMBO J* 18:6962-6972.
- Fan H, Turck CW, Derynck R. 2003. Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. *J Biol Chem* 278:18617-18627.
- Feinstein-Rotkopf Y, Arama E. 2009. Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes. *Apoptosis* 14:980-995.
- Feng HL, Sandlow JJ, Sparks AE, Sandra A, Zheng LJ. 1999. Decreased expression of the c-kit receptor is associated with increased apoptosis in subfertile human testes. *Fertil Steril* 71:85-89.
- Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Prenzel N, Ullrich A. 2004. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 24:5172-5183.
- Fraser LR, Drury LM. 1975. The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs. *Biol Reprod* 13:513-518.
- Garton KJ, Gough PJ, Philalay J, Wille PT, Blobel CP, Whitehead RH, Dempsey PJ, Raines EW. 2003. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem* 278:37459-37464.
- Gelling RW, Yan W, Al-Noori S, Pardini A, Morton GJ, Ogimoto K, Schwartz MW, Dempsey PJ. 2008. Deficiency of TNFalpha converting enzyme (TACE/ADAM17) causes a lean, hypermetabolic phenotype in mice. *Endocrinology* 149:6053-6064.
- Gnessi L, Fabbri A, Spera G. 1997. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 18:541-609.

- Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. 1994. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 218:314-319.
- Gong Y, Han XD. 2006. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reprod Toxicol* 22:623-630.
- Gong Y, Wu J, Huang Y, Shen S, Han X. 2009. Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Lett* 186:84-95.
- Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, Safe S, McDonnell DP, Gaido KW. 1998. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 142:203-214.
- Han X, Tu Z, Wang X, Shen S, Hou Y. 2004. Nonylphenol induced apoptosis in rat testis through the Fas/FasL pathway. *Bull Environ Contam Toxicol* 73:620-627.
- Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, Wicovsky A, Peters N, Warnke C, Pfizenmaier K, Wajant H. 2005. The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol* 168:1087-1098.
- Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. 2010. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech* 73:241-278.
- Hino T, Nakamura H, Abe S, Saito H, Inage M, Terashita K, Kato S, Tomoike H. 1999. Hydrogen peroxide enhances shedding of type I soluble tumor necrosis factor receptor from pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:122-128.
- Hirohashi N, La Spina FA, Romarowski A, Buffone MG. 2015. Redistribution of the intra-acrosomal EGFP before acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Reproduction*.
- Holdcraft RW, Braun RE. 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 27:335-342.
- Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Miyamoto K, Akiyama H, Takaishi H, Morioka H, Nakamura T, Okada Y, Blobel CP, Toyama Y. 2009. Conditional inactivation of TACE by a Sox9 promoter leads to osteoporosis and increased granulopoiesis via dysregulation of IL-17 and G-CSF. *J Immunol* 182:2093-2101.
- Horiuchi K, Le Gall S, Schulte M, Yamaguchi T, Reiss K, Murphy G, Toyama Y, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP. 2007. Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol Biol Cell* 18:176-188.
- Horiuchi K, Zhou HM, Kelly K, Manova K, Blobel CP. 2005. Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins beta1 and beta2. *Dev Biol* 283:459-471.
- Huynh T, Mollard R, Trounson A. 2002. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update* 8:183-198.
- Hyc A, Osiecka-Iwan A, Niderla-Bielinska J, Moskalewski S. 2011. Influence of LPS, TNF, TGF-ss1 and IL-4 on the expression of MMPs, TIMPs and selected cytokines in rat synovial membranes incubated in vitro. *Int J Mol Med* 27:127-137.
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 17:2839-2841.
- Inoue K, Wada M, Higuchi T, Oshio S, Umeda T, Yoshimura Y, Nakazawa H. 2002. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of

- bisphenol A in human semen. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 773:97-102.
- Issuree PD, Maretzky T, McIlwain DR, Monette S, Qing X, Lang PA, Swendeman SL, Park-Min KH, Binder N, Kallioliadis GD, Yamilina A, Horiuchi K, Ivashkiv LB, Mak TW, Salmon JE, Blobel CP. 2013. iRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 123:928-932.
- Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, Umata T, Miyado K, Tamai Y, Kurisaki T, Sehara-Fujisawa A, Ohno S, Mekada E. 1998. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J* 17:7260-7272.
- Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, Soder O. 2004. Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol Reprod* 70:290-296.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4892-4896.
- Kang Q, Cao Y, Zolkiewska A. 2000. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J* 352 Pt 3:883-892.
- Kawaguchi M, Inoue K, Sakui N, Ito R, Izumi S, Makino T, Okanouchi N, Nakazawa H. 2004. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 799:119-125.
- Killock DJ, Ivetic A. 2010. The cytoplasmic domains of TNFalpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *Biochem J* 428:293-304.
- Kim AH, Sasaki T, Chao MV. 2003. JNK-interacting protein 1 promotes Akt1 activation. *J Biol Chem* 278:29830-29836.
- Kimura T, Tomura H, Mogi C, Kuwabara A, Damirin A, Ishizuka T, Sekiguchi A, Ishiwara M, Im DS, Sato K, Murakami M, Okajima F. 2006. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 281:37457-37467.
- Kirkman-Brown JC, Punt EL, Barratt CL, Publicover SJ. 2002. Zona pellucida and progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 23:306-315.
- Klein T, Bischoff R. 2011. Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. *J Proteome Res* 10:17-33.
- Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270:96-99.
- Kobori H, Miyazaki S, Kuwabara Y. 2000. Characterization of intracellular Ca(2+) increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 63:113-120.

- Kralisch S, Klein J, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, Fasshauer M. 2005. Proinflammatory adipocytokines induce TIMP-1 expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 579:6417-6422.
- Kratzschmar J, Lum L, Blobel CP. 1996. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J Biol Chem* 271:4593-4596.
- Krystal GW, DeBerry CS, Linnekin D, Litz J. 1998. Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1. *Cancer Res* 58:4660-4666.
- Ku B, Liang C, Jung JU, Oh BH. 2011. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res* 21:627-641.
- Kuang AA, Diehl GE, Zhang J, Winoto A. 2000. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 275:25065-25068.
- Kveiborg M, Instrell R, Rowlands C, Howell M, Parker PJ. 2011. PKCalpha and PKCdelta regulate ADAM17-mediated ectodomain shedding of heparin binding-EGF through separate pathways. *PLoS One* 6:e17168.
- Lagos-Cabre R, Moreno RD. 2012. Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biol Res* 45:5-14.
- Le Gall SM, Bober P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, Gibb DR, Conrad D, Saftig P, Blobel CP. 2009. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 20:1785-1794.
- Le Magueresse-Battistoni B, Morera AM, Goddard I, Benahmed M. 1995. Expression of mRNAs for transforming growth factor-beta receptors in the rat testis. *Endocrinology* 136:2788-2791.
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138:2081-2088.
- Lee S, Suk K, Kim IK, Jang IS, Park JW, Johnson VJ, Kwon TK, Choi BJ, Kim SH. 2008. Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci Res* 86:2932-2942.
- Leonard JD, Lin F, Milla ME. 2005. Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochem J* 387:797-805.
- Levy DS, Kahana JA, Kumar R. 2009. AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* 113:1723-1729.
- Li D, Zhou Z, Qing D, He Y, Wu T, Miao M, Wang J, Weng X, Ferber JR, Herrinton LJ, Zhu Q, Gao E, Checkoway H, Yuan W. 2010. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum Reprod* 25:519-527.
- Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Wang J, Ferber J, Herrinton LJ, Gao E, Yuan W. 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril* 95:625-630 e621-624.

- Li X, Fan H. 2004. Loss of ectodomain shedding due to mutations in the metalloprotease and cysteine-rich/disintegrin domains of the tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme (TACE). *J Biol Chem* 279:27365-27375.
- Li X, Maretzky T, Weskamp G, Monette S, Qing X, Issuree PD, Crawford HC, McIlwain DR, Mak TW, Salmon JE, Blobel CP. 2015. iRhoms 1 and 2 are essential upstream regulators of ADAM17-dependent EGFR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:6080-6085.
- Li YJ, Song TB, Cai YY, Zhou JS, Song X, Zhao X, Wu XL. 2009. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci* 108:427-436.
- Lin YC, Richburg JH. 2014. Characterization of the role of tumor necrosis factor apoptosis inducing ligand (TRAIL) in spermatogenesis through the evaluation of trail gene-deficient mice. *PLoS One* 9:e93926.
- Liu C, Xu P, Lamouille S, Xu J, Derynck R. 2009. TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF- $\beta$  receptor downregulates TGF- $\beta$  signaling. *Mol Cell* 35:26-36.
- Liu S, Premont RT, Rockey DC. 2012. G-protein-coupled receptor kinase interactor-1 (GIT1) is a new endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) interactor with functional effects on vascular homeostasis. *J Biol Chem* 287:12309-12320.
- Lizama C, Alfaro I, Reyes JG, Moreno RD. 2007. Up-regulation of CD95 (Apo-1/Fas) is associated with spermatocyte apoptosis during the first round of spermatogenesis in the rat. *Apoptosis* 12:499-512.
- Lizama C, Lagos CF, Lagos-Cabre R, Cantuarias L, Rivera F, Huenchunir P, Perez-Acle T, Carrion F, Moreno RD. 2009. Calpain inhibitors prevent p38 MAPK activation and germ cell apoptosis after heat stress in pubertal rat testes. *J Cell Physiol* 221:296-305.
- Lizama C, Ludwig A, Moreno RD. 2011. Etoposide induces apoptosis and upregulation of TACE/ADAM17 and ADAM10 in an in vitro male germ cell line model. *Biochim Biophys Acta* 1813:120-128.
- Lizama C, Rojas-Benitez D, Antonelli M, Ludwig A, Bustamante-Marin X, Brouwer-Visser J, Moreno RD. 2010. TACE/ADAM17 is involved in germ cell apoptosis during rat spermatogenesis. *Reproduction* 140:305-317.
- Lizama C, Rojas-Benitez D, Antonelli M, Ludwig A, Moreno RD. 2012. Involvement of TACE/ADAM17 and ADAM10 in etoposide-induced apoptosis of germ cells in rat spermatogenesis. *J Cell Physiol* 227:829-838.
- Loechel F, Overgaard MT, Oxvig C, Albrechtsen R, Wewer UM. 1999. Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J Biol Chem* 274:13427-13433.
- Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD. 2005. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8:161-171.
- Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, Schmidt IM, Suomi AM, Virtanen HE, Petersen DV, Andersson AM, Toppari J, Skakkebaek NE. 2006. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 114:270-276.

- Maretzky T, McIlwain DR, Issuree PD, Li X, Malapeira J, Amin S, Lang PA, Mak TW, Blobel CP. 2013. iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:11433-11438.
- Maretzky T, Zhou W, Huang XY, Blobel CP. 2011. A transforming Src mutant increases the bioavailability of EGFR ligands via stimulation of the cell-surface metalloproteinase ADAM17. *Oncogene* 30:611-618.
- Marti JI, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. 2000. Assessment of the acrosomal status of ram spermatozoa by RCA lectin-binding and partition in an aqueous two-phase system. *J Androl* 21:541-548.
- Matsui J, Wakabayashi T, Asada M, Yoshimatsu K, Okada M. 2004. Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 279:18600-18607.
- Mauduit C, Besset V, Caussanel V, Benahmed M. 1996. Tumor necrosis factor alpha receptor p55 is under hormonal (follicle-stimulating hormone) control in testicular Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224:631-637.
- Mauduit C, Jaspard JM, Poncelet E, Charlet C, Revol A, Franchimont P, Benahmed M. 1993. Tumor necrosis factor-alpha antagonizes follicle-stimulating hormone action in cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 133:69-76.
- McClusky LM, de Jager C, Bornman MS. 2007. Stage-related increase in the proportion of apoptotic germ cells and altered frequencies of stages in the spermatogenic cycle following gestational, lactational, and direct exposure of male rats to p-nonylphenol. *Toxicol Sci* 95:249-256.
- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS. 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62:551-577.
- McIlwain DR, Lang PA, Maretzky T, Hamada K, Ohishi K, Maney SK, Berger T, Murthy A, Duncan G, Xu HC, Lang KS, Haussinger D, Wakeham A, Itie-Youten A, Khokha R, Ohashi PS, Blobel CP, Mak TW. 2012. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science* 335:229-232.
- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 57:149-179.
- Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, Ye X, Hauser R. 2010. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol* 30:532-539.
- Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. 2005. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16696-16700.
- Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML, Clay WC, Carter HL, Miller AB, Su JL, Lambert MH, Willard DH, Sheeley DM, Kost TA, Burkhart W, Moyer M, Blackburn RK, Pahel GL, Mitchell JL, Hoffman CR, Becherer JD. 1999. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J Biol Chem* 274:30563-30570.
- Montero JC, Yuste L, Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A, Pandiella A. 2000. Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Mol Cell Neurosci* 16:631-648.
- Moreno RD, Lizama C, Urzua N, Vergara SP, Reyes JG. 2006. Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* 325:533-540.

- Moreno RD, Urriola-Munoz P, Lagos-Cabre R. 2011a. The emerging role of matrix metalloproteases of the ADAM family in male germ cell apoptosis. *Spermatogenesis* 1:195-208.
- Moreno RD, Urriola-Muñoz P, Lagos-Cabre R. 2011b. The emerging role of matrix metalloproteases of the ADAM family in male germ cell apoptosis. *Spermatogenesis* 1:In Press.
- Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD, et al. 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385:733-736.
- Mullberg J, Durie FH, Otten-Evans C, Alderson MR, Rose-John S, Cosman D, Black RA, Mohler KM. 1995. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J Immunol* 155:5198-5205.
- Nakayama H, Fukuda S, Inoue H, Nishida-Fukuda H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. 2012. Cell surface-annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin. *Mol Biol Cell*.
- Nakayama K. 1997. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 327 ( Pt 3):625-635.
- New DC, Wong YH. 2007. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal* 2:2.
- Nishino Y, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Nakamura Y, Ikeda Y, Kobayashi H, Shimamoto K. 2004. Ischemic preconditioning activates AMPK in a PKC-dependent manner and induces GLUT4 up-regulation in the late phase of cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61:610-619.
- O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Abel M. 2012. Testicular development in mice lacking receptors for follicle stimulating hormone and androgen. *PLoS One* 7:e35136.
- Oehninger S, Franken DR, Ombelet W. 2014. Sperm functional tests. *Fertil Steril* 102:1528-1533.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122:787-794.
- Ortiz RJ, Lizama C, Codelia VA, Moreno RD. 2009. A molecular evaluation of germ cell death induced by etoposide in pubertal rat testes. *Mol Hum Reprod* 15:363-371.
- Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dolle P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P. 1996. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol* 135:469-477.
- Pak TR, Lynch GR, Ziegler DM, Lunden JB, Tsai PS. 2003. Disruption of pubertal onset by exogenous testosterone and estrogen in two species of rodents. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E206-212.
- Pan YQ, Guo QS, Wang RY, Xu C. 2008. [Estrogens affect Sertoli cells and the blood-testis barrier in pubertal rats]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 14:590-596.

- Park MA, Choi KC. 2014. Effects of 4-nonylphenol and bisphenol A on stimulation of cell growth via disruption of the transforming growth factor-beta signaling pathway in ovarian cancer models. *Chem Res Toxicol* 27:119-128.
- Park MA, Hwang KA, Choi KC. 2011. Diverse animal models to examine potential role(s) and mechanism of endocrine disrupting chemicals on the tumor progression and prevention: Do they have tumorigenic or anti-tumorigenic property? *Lab Anim Res* 27:265-273.
- Peiretti F, Canault M, Deprez-Beauchair P, Berthet V, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G. 2003. Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp Cell Res* 285:278-285.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284.
- Phillips KP, Tanphaichitr N. 2008. Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11:188-220.
- Poghosyan Z, Robbins SM, Houslay MD, Webster A, Murphy G, Edwards DR. 2002. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 277:4999-5007.
- Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A. 1999. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402:884-888.
- Qian W, Zhu J, Mao C, Liu J, Wang Y, Wang Q, Liu Y, Gao R, Xiao H, Wang J. 2014. Involvement of CaM-CaMKII-ERK in bisphenol A-induced Sertoli cell apoptosis. *Toxicology* 324:27-34.
- Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA. 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275:14608-14614.
- Riedl SJ, Shi Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:897-907.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16:2262-2270.
- Rogers JA, Metz L, Yong VW. 2013. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol* 53:421-430.
- Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, Blackburn RK, Weskamp G, Tempst P, Blobel CP. 1999. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* 274:3531-3540.
- Rozengurt E. 2007. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 213:589-602.
- Rufas O, Gilman A, Fisch B, Shalgi R. 1998. Spontaneous and follicular fluid-induced acrosome reaction in sperm samples from in vitro fertilizing and nonfertilizing normozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 15:84-89.
- Russell LB. 2004. Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse. *Genetica* 122:25-36.

- Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM. 2002. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod* 66:950-958.
- Ryan JJ, Huang H, McReynolds LJ, Shelburne C, Hu-Li J, Huff TF, Paul WE. 1997. Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Exp Hematol* 25:357-362.
- Sadate-Ngatchou PI, Payne CJ, Dearth AT, Braun RE. 2008. Cre recombinase activity specific to postnatal, premeiotic male germ cells in transgenic mice. *Genesis* 46:738-742.
- Sagi I, Milla ME. 2008. Application of structural dynamic approaches provide novel insights into the enzymatic mechanism of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Anal Biochem* 372:1-10.
- Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP. 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164:769-779.
- Salian S, Doshi T, Vanage G. 2009. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology* 265:56-67.
- Salvesen GS. 2002. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ* 9:3-5.
- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25:903-915.
- Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS. 2000. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 60:2464-2472.
- Sanderson MP, Erickson SN, Gough PJ, Garton KJ, Wille PT, Raines EW, Dunbar AJ, Dempsey PJ. 2005. ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J Biol Chem* 280:1826-1837.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17:1675-1687.
- Seals DF, Courtneidge SA. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17:7-30.
- Shapiro GD, Dodds L, Arbuckle TE, Ashley-Martin J, Fraser W, Fisher M, Taback S, Keely E, Bouchard MF, Monnier P, Dallaire R, Morisset A, Ettinger AS. 2015. Exposure to phthalates, bisphenol A and metals in pregnancy and the association with impaired glucose tolerance and gestational diabetes mellitus: The MIREC study. *Environ Int* 83:63-71.
- Sharpe RM. 2012. Sperm counts and fertility in men: a rocky road ahead. *Science & Society Series on Sex and Science*. *EMBO Rep* 13:398-403.
- Shetty J, Marathe GK, Dighe RR. 1996. Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* 137:2179-2182.
- Shi Y. 2002. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 10:285-288.
- Shi Y. 2006. Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol* 18:677-684.

- Siggs OM, Xiao N, Wang Y, Shi H, Tomisato W, Li X, Xia Y, Beutler B. 2012. iRhom2 is required for the secretion of mouse TNF $\alpha$ . *Blood* 119:5769-5771.
- Silva CM. 2004. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23:8017-8023.
- Silva D, Lizama C, Tapia V, Moreno RD. 2011. Propylthiouracil-induced hypothyroidism delays apoptosis during the first wave of spermatogenesis. *Biol Res* 44:181-188.
- Sinawat S. 2000. The environmental impact on male fertility. *J Med Assoc Thai* 83:880-885.
- Smith KM, Gaultier A, Cousin H, Alfandari D, White JM, DeSimone DW. 2002. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J Cell Biol* 159:893-902.
- Sola S, Aranha MM, Steer CJ, Rodrigues CM. 2007. Game and players: mitochondrial apoptosis and the therapeutic potential of ursodeoxycholic acid. *Curr Issues Mol Biol* 9:123-138.
- Soond SM, Everson B, Riches DW, Murphy G. 2005. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF $\alpha$ -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* 118:2371-2380.
- Suzuki A, Kadota N, Hara T, Nakagami Y, Izumi T, Takenawa T, Sabe H, Endo T. 2000. Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. *Oncogene* 19:5842-5850.
- Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S, Teague JL. 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 113:1056-1061.
- Swendeman S, Mendelson K, Weskamp G, Horiuchi K, Deutsch U, Scherle P, Hooper A, Rafii S, Blobel CP. 2008. VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ Res* 103:916-918.
- Tellier E, Canault M, Rebsomen L, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G, Peiretti F. 2006. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res* 312:3969-3980.
- ter Veld MG, Schouten B, Louisse J, van Es DS, van der Saag PT, Rietjens IM, Murk AJ. 2006. Estrogenic potency of food-packaging-associated plasticizers and antioxidants as detected in ER $\alpha$  and ER $\beta$  reporter gene cell lines. *J Agric Food Chem* 54:4407-4416.
- Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. 2002. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 17:1811-1819.
- Tichy A, Zaskodova D, Rezacova M, Vavrova J, Vokurkova D, Pejchal J, Vilasova Z, Cerman J, Osterreicher J. 2007. Gamma-radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. *Acta Biochim Pol* 54:281-287.
- Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. 2004. Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Arch Histol Cytol* 67:373-381.
- Tripathi R, Mishra DP, Shaha C. 2009. Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *J Reprod Immunol* 83:31-35.
- Urriola-Munoz P, Lagos-Cabre R, Moreno RD. 2014a. A mechanism of male germ cell apoptosis induced by bisphenol-A and nonylphenol involving ADAM17 and p38 MAPK activation. *PLoS One* 9:e113793.

- Urriola-Munoz P, Lizama C, Lagos-Cabre R, Reyes JG, Moreno RD. 2014b. Differential expression and localization of ADAM10 and ADAM17 during rat spermatogenesis suggest a role in germ cell differentiation. *Biol Res* 47:31.
- Venkatakishnan CD, Dunsmore K, Wong H, Roy S, Sen CK, Wani A, Zweier JL, Ilangovan G. 2008. HSP27 regulates p53 transcriptional activity in doxorubicin-treated fibroblasts and cardiac H9c2 cells: p21 upregulation and G2/M phase cell cycle arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H1736-1744.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51.
- Walker WH. 2009. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* 74:602-607.
- Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC, Jr. 2007. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem* 282:20036-20044.
- Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev* 30:119-132.
- Weikert S, Schrader M, Muller M, Krause H, Miller K. 2004. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in testicular tissue of infertile patients. *Int J Androl* 27:161-165.
- Weskamp G, Kratzschmar J, Reid MS, Blobel CP. 1996. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J Cell Biol* 132:717-726.
- Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 1813:521-531.
- Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, de Vere White RW, Knudsen KE. 2005. Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res* 65:54-65.
- WHO. 2002. Integrated Risk Assessment: Nonylphenol Case Study. World Health Organization.
- WHO. 2010a. Examination and processing of human semen. Switzerland, World Health Organization.
- WHO. 2010b. Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A. World Health Organization.
- Willems A, Batlouni SR, Esnal A, Swinnen JV, Saunders PT, Sharpe RM, Franca LR, De Gendt K, Verhoeven G. 2010. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PLoS One* 5:e14168.
- Wong CH, Cheng CY. 2005. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* 71:263-296.
- Xu P, Derynck R. 2010. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 37:551-566.
- Xu P, Liu J, Sakaki-Yumoto M, Derynck R. 2012. TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. *Sci Signal* 5:ra34.
- Yamamoto CM, Hikim AP, Lue Y, Portugal AM, Guo TB, Hsu SY, Salameh WA, Wang C, Hsueh AJ, Swerdloff RS. 2001. Impairment of spermatogenesis in transgenic mice

- with selective overexpression of Bcl-2 in the somatic cells of the testis. *J Androl* 22:981-991.
- Yan S, Chen Y, Dong M, Song W, Belcher SM, Wang HS. 2011. Bisphenol A and 17beta-estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling. *PLoS One* 6:e25455.
- Yan W, Huang JX, Lax AS, Pelliniemi L, Salminen E, Poutanen M, Toppari J. 2003. Overexpression of Bcl-W in the testis disrupts spermatogenesis: revelation of a role of BCL-W in male germ cell cycle control. *Mol Endocrinol* 17:1868-1879.
- Yan W, Suominen J, Samson M, Jegou B, Toppari J. 2000a. Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 165:115-129.
- Yan W, Suominen J, Toppari J. 2000b. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *J Cell Sci* 113 ( Pt 1):161-168.
- Yan Y, Zhang J, Guo JL, Huang W, Yang YZ. 2009. Multiple shRNA-mediated knockdown of TACE reduces the malignancy of HeLa cells. *Cell Biol Int* 33:158-164.
- Yao PL, Lin YC, Richburg JH. 2009. TNF alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to Sertoli cell injury in rodents is partially regulated by MMP2. *Biol Reprod* 80:581-589.
- Yao PL, Lin YC, Sawhney P, Richburg JH. 2007. Transcriptional regulation of FasL expression and participation of sTNF-alpha in response to sertoli cell injury. *J Biol Chem* 282:5420-5431.
- Yin J, Yu FS. 2009. ERK1/2 mediate wounding- and G-protein-coupled receptor ligands-induced EGFR activation via regulating ADAM17 and HB-EGF shedding. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:132-139.
- Youle RJ, Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47-59.
- Yuan TL, Cantley LC. 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27:5497-5510.
- Zhai D, Jin C, Huang Z, Satterthwait AC, Reed JC. 2008. Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J Biol Chem* 283:9580-9586.