



**Pontificia Universidad Católica De Chile**  
**Facultad De Ciencias Biológicas**  
**Departamento De Fisiología**

**LOS PLASTICIDAS BISFENOL-A Y NONILFENOL  
INDUCEN APOPTOSIS DE CÉLULAS GERMINALES  
DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS A TRAVÉS  
DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE LA  
ADAM17**

TESIS ENTREGADA A LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN  
CIENCIAS FISIOLÓGICAS

**RAÚL CRISTIÁN LAGOS CABRÉ**

Directores:  
**Dr. Ricardo D. Moreno**  
**Dr. Juan C. Sáez**

JULIO 2013



## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al Dr. Moreno y a los miembros de su laboratorio por soportarme tanto tiempo (casi 8 años) para llevar a cabo mis estudios de pre y postgrado.

A los Doctores Juan C. Saéz y Pablo Saéz por su ayuda en los experimentos de esta tesis y sus relevantes comentarios.

También me gustaría agradecer al Dr. Juan Reyes y a Joaquín Paillamanque, de la Universidad Católica de Valparaíso, por su ayuda en los experimentos de aislación de células germinales.

Agradecer al Dr. Owen y su laboratorio por la buena voluntad y por la ayuda prestada.

Pero en especial me gustaría agradecer a Paulina Urriola. Sin ella, esta tesis seguiría en elaboración y probablemente no hubiese terminado nunca. Quiero darle las gracias por su apoyo incondicional durante este proceso dentro y fuera del laboratorio. Espero seguir agradeciéndole siempre.

Agradezco también a CONICYT por la beca de mantención y de apoyo de tesis doctoral (AT-24100089).

## Contenido

Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tablas.....	viii
Abreviaturas y símbolos.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiv
1. Introducción.....	1
1.1 <i>La espermatogénesis en mamíferos</i> .....	3
1.2 <i>Mecanismos básicos de apoptosis en la espermatogénesis</i> .....	9
1.3 <i>Apoptosis inducida en la espermatogénesis</i> .....	10
1.4 <i>Los xenoestrógenos como inductores de apoptosis en células germinales</i> .....	13
1.5 <i>Las metaloproteasas de la familia ADAM como posibles inductoras de apoptosis</i> 18	
2. Planteamiento del problema:.....	21
3. Hipótesis.....	22
4. Objetivo general.....	22
4.1. Objetivos específicos.....	22
5. Materiales y métodos.....	24
6. Resultados.....	37
6.1. <i>Establecer si la inhibición de las ADAMs10 o 17 previene la apoptosis de células germinales inducida por BPA y/o NP en testículos de rata de 21 días</i> .....	37

6.1.1. ADAM17, pero no ADAM10, participa en la apoptosis inducida por xenoestrógenos .....	44
6.2. <i>Evaluar si los xenoestrógenos BPA y NP alteran los niveles y localización de las ADAM9, ADAM10 y ADAM17 en el testículo de ratas de 21 días</i> .....	53
6.2.1 BPA y NP inducen la localización de la ADAM17 en la superficie de las células germinales.....	60
6.3. <i>Determinar si p38MAPK participa en la apoptosis dependiente de la ADAM17 inducida por BPA o NP.</i> .....	69
6.4. <i>Establecer si el aumento en los niveles de la <math>[Ca^{2+}]_i</math> provocado por el BPA o NP regulan los niveles y la activación/maduración de la ADAM17.</i> .....	78
7. Discusión .....	100
7.1. <i>Análisis del efecto de los xenoestrógenos sobre la muerte celular.</i> .....	100
7.2. <i>Análisis del efecto de los xenoestrógenos sobre proteínas ADAM.</i> .....	102
7.3. <i>Análisis del efecto del estrés oxidativo y participación de proteínas quinasas.</i> .....	105
7.4. <i>Análisis del efecto del aumento de la <math>[Ca^{2+}]_i</math> sobre la activación de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos</i> .....	107
8. Anexo Figuras: .....	115
9. Referencias .....	125

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> BPA y NP inducen muerte celular en testículo de rata.....	39
<b>Figura 2:</b> El tratamiento con BPA o NP aumenta el número de células positivas para la caspasa-3 activa y TUNEL en testículos de rata.....	42
<b>Figura 3:</b> Curso temporal del corte proteolítico de PARP en testículos de rata tratados con xenoestrógenos.....	43
<b>Figura 4:</b> Efecto de GI254023X y GW280264X sobre muerte celular por apoptosis inducida por xenoestrógenos en testículos de rata.....	45
<b>Figura 5:</b> Efecto de BPA y NP sobre liberación de TNF- $\alpha$ en células de Sertoli.....	48
<b>Figura 6:</b> NP induce un aumento en la actividad de la ADAM17 en cultivos primarios de células de Sertoli.....	49
<b>Figura 7:</b> BPA y NP inducen muerte de células germinales de una forma independiente de Fas y FasL.....	51
<b>Figura 8:</b> El tratamiento con BPA o NP aumenta los niveles de mRNA de la ADAM17 pero no afecta los niveles de mRNA de las ADAMs9 y 10. ....	54
<b>Figura 9:</b> BPA y NP afectan diferencialmente los niveles proteicos de tres miembros de la familia ADAM.....	56
<b>Figura 10:</b> Localización de la ADAM10 en testículo de rata de 21 días después de 24 horas de la administración de BPA y NP.....	58
<b>Figura 11:</b> Localización de la ADAM17 en testículos de ratas de 21 días después de la administración de BPA y NP por 24 horas. ....	59
<b>Figura 12:</b> Niveles en la superficie celular de la ADAM17 madura en células de Sertoli.	63
<b>Figura 13:</b> Células positivas para la ADAM17 expresan marcadores de células germinales y de Sertoli.....	64

<b>Figura 14:</b> La localización de la ADAM17 en la superficie celular inducido por BPA o NP es modulado por ADAM17 y p38 <sup>MAPK</sup> .....	67
<b>Figura 15:</b> La intensidad de fluorescencia de la ADAM17 en la superficie de células testiculares aisladas no cambia no cambia luego de la aplicación de BPA o NP. ....	68
<b>Figura 16:</b> Los inhibidores de p38 <sup>MAPK</sup> reducen los niveles de la ADAM17 madura en testículos de rata.....	71
<b>Figura 17:</b> Participación de p38 <sup>MAPK</sup> en la muerte celular inducida por los xenoestrógenos BPA y NP.....	73
<b>Figura 18:</b> Distribución de MDA en testículos de rata tratados con BPA o NP. ....	75
<b>Figura 19:</b> Efecto en la nitración de proteínas testiculares por los tratamientos de BPA o NP. ....	76
<b>Figura 20:</b> La muerte celular inducida por BPA o NP en testículos de rata es dependiente de estrés oxidativo.. ....	79
<b>Figura 21:</b> Efecto del ingreso y liberación de Ca <sup>2+</sup> sobre la actividad de la ADAM17.....	81
<b>Figura 22:</b> Captación de bromuro de etidio por cultivos primarios de células de Sertoli. .	84
<b>Figura 23:</b> La [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> en células de Sertoli en cultivo tratadas con BPA o NP es disminuida por la aplicación La <sup>3+</sup> .....	86
<b>Figura 24:</b> La [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> no cambia en células LnCap tratadas con BPA o NP. ....	87
<b>Figura 25:</b> Evaluación de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> y la actividad de la ADAM17 en células LnCap tratadas con ATP.....	90
<b>Figura 26:</b> Los xenoestrógenos inducen un aumento en la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> en espermátocitos en paquiteno aislados y en suspensión. ....	93
<b>Figura 27:</b> Los xenoestrógenos inducen un aumento en la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> en espermátidas redondas aisladas y en suspensión. ....	94

<b>Figura 28:</b> Intensidad de fluorescencia de la ADAM17 en la superficie de espermatoцитos y espermátidas aisladas.....	95
<b>Figura 29:</b> Actividad de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos en presencia de medio con o sin $\text{Ca}^{2+}$ y del uso del quelante de $\text{Ca}^{2+}$ , BAPTA-AM.....	97
<b>Figura 30:</b> Los HCs formado por pannexinas o conexinas no median la activación de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos..	98
<b>Figura 31:</b> Modelo de acción de NP y BPA sobre la ADAM17. ....	112

### Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> .....	27
<b>Tabla 2</b> .....	102

## Abreviaturas y símbolos

(AP)-NRG- $\beta$ 1:	Plasmidio que contiene proteína de fusión neuregulina-FA
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> :	Concentración intracelular de Ca <sup>2+</sup>
A23187:	Ionoforo de Ca <sup>2+</sup>
ADAM:	<i>A desintegrin and Metalloprotease</i>
AR:	Receptor de andrógeno
ATP:	Adenosina tri-fosfato
BB94:	Batimastat (inhibidor de metaloproteasas)
BPA:	Bisfenol-A
Ca <sup>2+</sup> :	Ion Calcio
CBX:	Carbenoxolona, inhibidor de panexinas
ER:	Receptor de estrógeno
FA:	Fosfatasa alcalina
FAS:	Receptor de muerte de superficie celular <i>FAS</i>
FASL:	Ligando de receptor <i>FAS</i>
LnCap:	Línea celular derivada de cáncer de próstata
MAPK:	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MDA:	Malondialdehído (peroxilípido)
NP:	Nonilfenol
P2X:	Receptores de ácidos nucleicos extracelulares
Panx:	Pannexinas
PARP:	Polimerasa de poli ADP ribosas
PD169316:	Inhibidor de p38

RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de Oxígeno
SERCA:	ATP-asa de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo sarco/endoplasmático
SubG1:	Población celular que posee DNA fragmentado
TM4:	Línea celular derivada de células de Sertoli de Ratón.
TNF- $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL:	Marcaje de corte terminal mediado por deoxinucleotidil transferasa
$\beta$ -Ga:	Ácido 18 alfa,beta-glicinoretinoico, inhibidor de hemicanales

## Resumen

Los xenoestrógenos son moléculas con actividad estrogénica y antiandrogénica, que pueden interferir en procesos biológicos como la espermatogénesis, aumentando la apoptosis de las células germinales. El bisfenol-A y el 4-nonilfenol son dos xenoestrógenos que se encuentran abundantemente en el medio ambiente y que producen muerte de las células germinales en los testículos de rata. Además, estos compuestos afectan negativamente a los niveles hormonales y las características sexuales secundarias de los animales y humanos, las que pueden ser heredadas a la progenie, demostrando, también, que poseen efectos transgeneracionales.

La espermatogénesis es el proceso por el cual se generan los espermatozoides, gametos masculinos, a partir de una célula diploide llamada espermatogonia y culmina con la liberación de un espermatozoide especializado, haploide pero sin motilidad, la que se adquiere en el epidídimo. Este proceso es especialmente sensible a los xenoestrógenos y los efectos negativos de estos compuestos sobre la espermatogénesis han sido ampliamente documentados. Sin embargo, sólo unos pocos artículos detallan algunos mecanismos que pueden ser activados por dichos xenoestrógenos. El objetivo de esta tesis es determinar qué mecanismos están involucrados en la muerte de las células germinales inducida por xenoestrógenos. En este sentido, a partir de datos preliminares de nuestro laboratorio e información publicada por otros grupos, proponemos que las proteínas de la familia ADAM participan en los efectos negativos provocados por los xenoestrógenos.

Las proteínas ADAMs son metaloproteasas de la membrana celular, que tienen la función de liberar los ectodominios de sustratos al medio externo desde la membrana

plasmática y modificar la matriz extracelular. La actividad de algunos miembros de la familia ADAM se relaciona con la muerte por apoptosis, que ocurre durante la espermatogénesis, y es sabido que estas metaloproteasas son activadas por distintos estímulos externos, como drogas, estrés oxidativo, proteínas quinasas y aumento de la concentración de ion calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). El miembro más estudiado y ubicuo de esta familia es la ADAM17, la cual está relacionada con la apoptosis de células germinales activada con etopósido, una droga anti cancerígena.

Hemos probado que en el modelo utilizado (Rata) responde a los xenoestrógenos, ya que aumentó la muerte de células germinales en testículos de rata de 21 días de edad, que corresponde a ratas prepuberales, siendo un modelo excelente para el estudio del efecto de los xenoestrógenos debido a que estos compuestos actúan en ciertas etapas del desarrollo afectando de mayor manera el tracto reproductivo. Además, observamos que aumentan las especies reactivas de oxígeno (ROSs) en testículos de rata tratadas con xenoestrógenos, lo que concuerda con datos expuestos en la literatura. La inhibición farmacológica de la ADAM17 previno significativamente la muerte inducida por estos xenoestrógenos, sugiriendo que esta metaloproteasa participa en este mecanismo. Las ROSs generadas por los xenoestrógenos pueden ser en parte responsables de la muerte celular inducida por xenoestrógenos, ya que en células tratadas con antioxidantes la apoptosis disminuye, al igual que lo observado con la inhibición de p38<sup>MAPK</sup>, la cual reduce significativamente la muerte celular inducida por xenoestrógenos. Los niveles proteicos de la ADAM17 no cambiaron en presencia de xenoestrógenos, sugiriendo que los xenoestrógenos podrían actuar aumentando la actividad de la ADAM17. Para comprobar esto, estudiamos la localización de la ADAM17 en la superficie celular, ya que es una buena aproximación a la activación de esta metaloproteasa, debido a que sólo la ADAM17

activa se localiza en membrana. Observamos que efectivamente aumenta la localización de la ADAM17 en la superficie de las células germinales aisladas, lo que fue dependiente de la activación de p38<sup>MAPK</sup>. Esta interpretación fue apoyada por resultados obtenidos en células transfectadas con un sustrato de la ADAM17 acoplado a fosfatasa alcalina, lo que permite estudiar de forma indirecta la actividad de la ADAM17, mediante la medición de la actividad fosfatasa en el medio de cultivo. Los resultados fueron consistentes con los de la ADAM17 en la superficie celular.

Para identificar el mecanismo que activa la ADAM17, propusimos estudiar si los aumentos de la  $[Ca^{2+}]_i$  producido por los xenoestrógenos participan en la activación de la ADAM17. Observamos que la ADAM17 responde al aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido con un ionóforo de  $Ca^{2+}$ , y que la actividad de la ADAM17 disminuye en presencia de quelantes de  $Ca^{2+}$  o del uso de una solución extracelular libre de  $Ca^{2+}$ . Los xenoestrógenos aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$  por un mecanismo que puede involucrar ingreso de  $Ca^{2+}$  desde el exterior o liberación de  $Ca^{2+}$  de reservorios intracelulares. Nuestros resultados muestran que la ADAM17 responde al ingreso y no a la liberación de  $Ca^{2+}$  de reservorios internos. Por esto, decidimos estudiar si este ingreso de  $Ca^{2+}$  podría estar mediado por hemicanales formados por pannexinas, los que son permeables a  $Ca^{2+}$ , por lo tanto podrían mediar aumentos en la  $[Ca^{2+}]_i$  debido a que están acopladas a receptores P2X. La activación de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos no se relacionó con un aumento en la permeabilidad de los hemicanales formados por pannexinas, debido a que los inhibidores de estos no redujeron la actividad de la ADAM17 ni su localización en membrana. Aún así, nuestros resultados avalan la participación de la ADAM17 como un nuevo miembro del mecanismo de la muerte celular inducida por xenoestrógenos, un proceso dependiente de la p38<sup>MAPK</sup> y estrés oxidativo.

## **Abstract**

Xenoestrogens are molecules with estrogenic and antiandrogenic activity that may interfere with biological processes such as spermatogenesis, increasing germ cell apoptosis. Bisphenol-A and 4-nonylphenol are two xenoestrogens found in the environment and are known to cause germ cell death in rat testis. They also have negative effects on hormone levels and secondary sexual characteristics of animals and humans. Although exposure to these compounds does not produce death of the organism, they have negative effects on reproduction, which can be inherited to the progeny, demonstrating that they have transgenerational effects.

Spermatogenesis is the process by which males generate sperms, from a diploid cell called spermatogonia and culminates with the release of haploid and specialized but not motile spermatozoa. This process is particularly sensitive to xenoestrogens and is the negative effects of xenoestrogens on spermatogenesis are well documented. However, only a few articles show information about mechanisms activated by these xenoestrogens. The aim of this thesis is to determine which mechanisms are involved in germ cell death induced by xenoestrogens. In this regard, based on preliminary data from our laboratory and information published by other groups, we propose that the ADAM family proteins may be involved on the negative effects caused by xenoestrogens.

ADAM proteins are membrane metalloproteases having the function of releasing the ectodomain of substrates into the external environment from the plasma membrane and alter the extracellular matrix. The activity of some ADAM family members is associated with apoptosis in spermatogenesis, and it is known that these metalloproteases can be

activated by different external stimuli such as drugs, oxidative stress, protein kinases and increased intracellular free calcium ions concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). The most studied and ubiquitous member of this family is ADAM17, which is related to germ cell apoptosis triggered by etoposide, an anticancer drug.

The model used in the present work (Rat) responded to xenoestrogens because we observed an increased germ cell death in testes 21 days old animals, corresponding to prepubertal rats, being an excellent model for studying the effect of xenoestrogens because these compounds act in certain stages of development in a major way affecting the reproductive tract. Also, we detected an increase in reactive oxygen species (ROS) in testis after xenoestrogen treatment. Inhibition of ADAM17 significantly prevented cell death induced by these xenoestrogens, suggesting the involvement of this metalloprotease in this mechanism. The same was observed when antioxidants or p38<sup>MAPK</sup> inhibitors were administered prior xenoestrogens treatment. We note that these metalloprotease do not change its protein levels (Western blot analysis) after xenoestrogens administration, suggesting that these compounds may act by increasing the ADAM17 activity. To verify this, we studied the location of ADAM17 at the cell surface, because it is directly related to activation of this metalloproteinase, since only the active ADAM17 is located in plasma membrane. We noted that, levels of ADAM17 located in the surface increased in isolated germ cells, and this relocalization depended on p38<sup>MAPK</sup>. These results were tested using transfected cells with an ADAM17 substrate coupled to alkaline phosphatase, which allow evaluating the activity of ADAM17 indirectly by measuring the alkaline phosphatase activity in the culture medium. The results were consistent with those of the ADAM17 on the cell surface.

To study the mechanism involved in the ADAM17 activation, we decided to study whether increases in  $[Ca^{2+}]_i$  produced by xenoestrogens were responsible for the ADAM17 activation. Our results show that ADAM17 respond to a rise in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by a ionophore, and that the ADAM17 activity decreases in the presence of  $Ca^{2+}$  chelators or the use of extracellular  $Ca^{2+}$ -free saline solution. Xenoestrogens increase the  $[Ca^{2+}]_i$  by a mechanism that may involve influx from the extracellular medium or release from intracellular stores. Our results show that ADAM17 caused  $Ca^{2+}$  influx rather than release from internal reservoirs. Then, we studied whether the  $Ca^{2+}$  influx could be mediated by pannexins hemichannels, which are permeable to  $Ca^{2+}$  and can be coupled to P2X receptors. However, inhibitors of this hemichannels did not reduce the ADAM17 activity or its location in plasma membrane, suggesting that they are not involved in the mechanism of ADAM17 activation.

However, our results support the involvement of ADAM17 as a new member of the mechanism of germ cell death induced by xenoestrogens, in a process dependent of  $p38^{MAPK}$  and oxidative stress.

## 1. Introducción

Xenoestrógenos es el nombre genérico dado a un gran número de moléculas sintéticas (hechas por el hombre) que inducen efectos estrogénicos y antiandrogénicas en animales, incluyendo al humano. Los xenoestrógenos se encuentran entre los tóxicos que pueden causar infertilidad, junto a otras patologías asociadas a anormalidades en el desarrollo. El bisphenol A [2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane] (BPA), el 4-nonylphenol (NP) y el di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), y su metabolito activo, el mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), son xenoestrógenos utilizados en la industria del plástico y pueden ser encontrados en policarbonatos, juguetes, artículos de odontología, envases de comida, bolsas de sangre y cosméticos (Guenther et al., 2002; ter Veld et al., 2006; EC-SCF, 2007). A pesar de los efectos estrogénicos de los xenoestrógenos, ensayos *in vitro* han demostrado que la afinidad de algunos de ellos al receptor de estrógeno (tales como BPA, NP y DEHP) es ~10.000 veces menor que el estradiol (E2) (ter Veld et al., 2006), sugiriendo que estas moléculas podrían actuar, también, por vías alternativas a las activadas por este receptor nuclear.

Ya han sido descritas anormalidades reproductivas en la vida silvestre cuando los xenoestrógenos están presentes en el ambiente, por ejemplo: cambios en el número de machos y hembras en peces, en los cuales también se registra un descenso en el conteo espermático y una disminución en el tamaño del pene de caimanes, junto con una reversión de sexo de estos animales (Guillette et al., 1999; Hashimoto et al., 2000; Stoker et al., 2003; Milnes et al., 2006).

Diversos estudios de salud pública sugieren una gran asociación entre la exposición a xenoestrógenos y diversas anomalías reproductivas. Estudios clínicos indican que la exposición al DEHP durante el embarazo se correlaciona con el nacimiento de niños con un bajo peso al nacer (Zhang et al., 2009) y con una disminución del índice de distancia ano-genital (AGI, por sus siglas en inglés) en niñas expuestas al MEHP (Huang et al., 2009). También se ha observado un AGI reducido, la que se acompaña con testículos no descendidos al escroto en niños expuestos *in útero* a ftalatos (Swan et al., 2005), y diversas anormalidades en las características sexuales secundarias en niños de ambos sexos, incluyendo menarquía adelantada (Roy et al., 2009).

Los humanos estamos expuestos a concentraciones de 10 µg/día en el caso del BPA; 7,5 µg/día en el caso del NP y 30 µg/día en el caso del DEHP (Doull et al., 1999; Guenther et al., 2002; EC-SCF, 2007), los que han sido detectados en muestras humanas como: plasma, orina, fluido amniótico, leche materna e incluso semen (Inoue et al., 2002; Calafat et al., 2005; Swan et al., 2005; Main et al., 2006; Phillips and Tanphaichitr, 2008; Han et al., 2009; Huang et al., 2009; Zhang et al., 2009).

Es así como existe una gran preocupación por los efectos de los xenoestrógenos en los humanos, y en el mundo animal, debido al incremento de patologías asociadas con el desarrollo testicular, que podrían ser explicadas por la acción de estos compuestos en distintas etapas del desarrollo humano. Es por esto, que el tema central de esta Tesis consiste en estudiar los efectos agudos de dos xenoestrógenos: BPA y NP en la apoptosis de células germinales masculinas durante la pubertad. La hipótesis planteada es que estos compuestos inducen apoptosis de células germinales por un mecanismo que involucra la

activación de la metaloproteasa ADAM17, similar a lo que nuestro laboratorio ha descrito que ocurre con compuestos genotóxicos como el etoposide (Ortiz et al., 2009; Lizama et al., 2011). Para entender mejor el problema, comenzaremos esta Introducción explicando el proceso de la espermatogénesis, para luego seguir con apoptosis y lo que se sabe sobre el efecto de los xenoestrógenos en la espermatogénesis. Finalizaremos con una breve revisión acerca de la estructura y función de las metaloproteasas de la familia ADAM en el desarrollo y en particular de su vínculo con la apoptosis de células germinales durante la espermatogénesis.

### **1.1 La espermatogénesis en mamíferos**

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación que se inicia con una célula troncal diploide llamada espermatogonia, y concluye con una célula diferenciada, haploide: el espermatozoide. En el adulto, la espermatogénesis comienza cuando las espermatogonias del tipo A (células troncales germinales) entran en mitosis, lo que se cree origina a dos poblaciones de células: aquellas que serán nuevamente espermatogonias tipo A, y aquellas que entrarán en la espermatogénesis (Hermo et al., 2010a). Estas últimas comienzan a multiplicarse en una serie de 10-12 divisiones celulares lo cual amplifica enormemente el número de células. Posteriormente, las ahora llamadas espermatogonias B, entrarán en meiosis y pasarán a llamarse espermatocitos, dando como resultado, después de las dos divisiones meióticas, cuatro espermátidas redondas (haploides) por cada espermatocito que entra en la espermatogénesis (Hermo et al., 2010a; Lagos-Cabre and Moreno, 2012a). La generación de los espermatozoides a partir de las espermátidas redondas se denomina espermiogenesis, el que culmina con la liberación del

espermatozoide (espermiación) desde el epitelio seminífero al lumen del túbulo seminífero (Moreno and Alvarado, 2006; Hermo et al., 2010a; Lagos-Cabre and Moreno, 2012a).

La espermatogénesis depende de diversos eventos, tales como: crecimiento, migración, proliferación y muerte celular, la cual regula y permite que sólo las células en buenas condiciones progresen (Moreno and Alvarado, 2006; Tripathi et al., 2009; Hermo et al., 2010a). La espermatogénesis es muy sensible a factores como: compuestos genotóxicos, niveles hormonales, infecciones, temperatura, radiación y estrés oxidativo, muchos de los cuales pueden gatillar apoptosis en las células germinales (Tripathi et al., 2009). De esta forma, un aumento en la tasa de apoptosis disminuye la producción de espermatozoides, contribuyendo a la infertilidad masculina de manera similar a lo que ocurre en hombres con arresto en la maduración espermática o con síndrome de Sertoli-Solo (Kim et al., 2007; Hermo et al., 2010a).

Dentro de este proceso, las células de Sertoli cumplen una importante función al ser las encargadas de nutrir y regular el crecimiento de las células germinales mediante la entrega de nutrientes esenciales, como es el caso del lactato, molécula usada por las células germinales como fuente de energía (Bustamante-Marin et al., 2012), también mediante la secreción de citoquinas y por la regulación hormonal que efectúan estas células hacia las células germinales (Sofikitis et al., 2008; Hermo et al., 2010a). Las células de Sertoli expresan la citoquina *stem cell factor* (SCF), la cual se une al receptor c-kit, expresado por células germinales en roedores y humanos (Sofikitis et al., 2008; Hermo et al., 2010a). Esta interacción permite que las células de Sertoli puedan regular el crecimiento y mitosis de las células germinales, mientras actúa como un mecanismo de adhesión para las células germinales (Hermo et al., 2010a). Otras interacciones de tipo ligando-receptor importantes entre células de Sertoli y células germinales, es la que se da entre el ligando *glial cell line-*

*derived neurotrophic factor* (GDNF), expresado por células de Sertoli y su receptor *GDNF family receptor alpha 1* (GFRA1), expresado por células germinales. Bajos niveles de GDNF producen una disminución en el número de células germinales indiferenciadas, mientras que altos niveles de GDNF aumentan el número de estas (Sofikitis et al., 2008; Hermo et al., 2010a). Además de las citoquinas mencionadas, existen muchas otras moléculas que participan en la regulación del crecimiento de células germinales que son generadas por célula de Sertoli, como: FGF, TGF, piruvato, activina, inhibina y receptor de andrógenos (AR), entre otras (Petersen and Soder, 2006). Las células de Sertoli regulan la producción de citoquinas necesarias para la supervivencia de las células germinales mediante factores de transcripción como el ERM, el cual permite mantener los niveles de las citoquinas mencionadas anteriormente. Cuando el ERM sufre alguna mutación inactivante, se impide la renovación de células germinales, generando situación de tipo Sertoli-Solo por pérdida de espermatogonias (Kim et al., 2007; Hermo et al., 2010a). La interacción ligando-receptor puede ser regulada mediante el clivaje de uno de los dos componentes (ligando o receptor) mediante proteasas extracelulares como las metaloproteasas de matriz extracelular o por las proteínas ADAM (Lizama et al., 2010b), lo que discutiremos más adelante.

Respecto a la regulación hormonal de la espermatogénesis, la hormona folículo-estimulante (FSH) corresponde a una de las principales hormonas reguladoras de la espermatogénesis, siendo las células de Sertoli las únicas dentro del testículo que poseen receptores para FSH (Petersen and Soder, 2006; Sofikitis et al., 2008). La FSH permite que las células de Sertoli expresen aromatasa, receptores de andrógenos, inhibina y lactato, necesario para el crecimiento de células germinales (Petersen and Soder, 2006). La ausencia de la regulación mediada por FSH lleva a una disminución o a la cesación de la

producción de espermatozoides (Petersen and Soder, 2006). Otra hormona involucrada en la regulación de las células de Sertoli es la hormona tiroidea, la cual es importante para la maduración de las células de Sertoli, y por lo tanto, para la espermatogénesis, ya que una disminución en los niveles de esta hormona conlleva un aumento de la proliferación de células de Sertoli, las cuales deben dejar de proliferar en la pubertad para dar paso a su maduración y crecimiento de células germinales, con lo que se produce un exceso de células de Sertoli en una afección similar al síndrome de Sertoli-Solo (Petersen and Soder, 2006; Hermo et al., 2010b). La hormona masculina por excelencia es la testosterona, la cual es producida por las células de Leydig, que son células somáticas fuera de los túbulos seminíferos y que producen esta hormona mediante la regulación de la hormona luteinizante, LH, secretada por la hipófisis, al igual que la FSH. Las células de Sertoli expresan AR, pero no las células germinales, por lo que las células de Sertoli nuevamente constituyen un lazo de comunicación entre las células germinales y el ambiente, favoreciendo la proliferación y entrada en meiosis de las células germinales, además de prevenir la apoptosis de estas células (Petersen and Soder, 2006; Sofikitis et al., 2008; Hermo et al., 2010b). La ausencia de testosterona intratesticular lleva a las espermátidas elongadas, etapa previa a un espermatozoide maduro, a no entrar en el proceso de espermiogénesis (formación de espermatozoides) (Sofikitis et al., 2008), quizá por una regulación negativa en las uniones celulares de espermátidas elongadas y células de Sertoli, lo que será mostrado más adelante.

Los estrógenos, como el estradiol, se han catalogado como hormonas negativas para el desarrollo de la espermatogénesis, sin embargo, la presencia de receptores de estrógeno (ER) y producción *in situ* de estradiol, principalmente en células de Sertoli y Leydig, permite pensar que estas hormonas, catalogadas principalmente como hormonas

femeninas, tienen funciones fisiológicas en el testículo y en la espermatogénesis, lo que se demuestra al comprobar que los espermatozoides no motiles poseen un 30% menos actividad aromatasa (enzima encargada de la producción de estradiol a partir de testosterona), lo mismo ocurre cuando se comparan espermatozoides de hombre normales con hombre azoospermicos, estos últimos poseen un 52% menos de actividad aromatasa en los espermatozoides (Carreau et al., 2007), sugiriendo que el estradiol podría estar involucrado en la motilidad espermática. Los estrógenos median su acción principalmente a través de los ER, de los cuales existen dos isoformas; ER $\alpha$  y ER $\beta$ , los cuales poseen, además de un sitio de unión a ligando, un dominio de unión a DNA, por el cual regulan la transcripción de genes dependientes de estrógenos para su expresión (O'Donnell et al., 2001), respuesta que puede tardar horas, las cuales se conocen como respuestas genómicas. La prueba más importante de la funcionalidad de los estrógenos durante la espermatogénesis proviene de estudios en ratones ERKO (ratones nulos para el receptor de estrógeno), en los cuales se registra infertilidad masculina ante la ausencia de cualquiera de las dos isoformas, ER $\alpha$  ó ER $\beta$  (Carreau et al., 2012), demostrando que estas hormonas son importantes en el tracto reproductor masculino, sin embargo, un exceso de los niveles de estrógeno, como el estradiol, también produce una disminución de la espermatogénesis e infertilidad (O'Donnell et al., 2001), demostrando la fina regulación de estas hormonas. Independientemente de los receptores expuestos anteriormente, los estrógenos inducen respuestas no-genómicas rápidas, las que tardan de segundos a minutos, entre las que destacan activación de MAPK, PKC, PKA y PI3K, además de aumentos en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), entre otras (Nadal et al., 2000; Quesada et al., 2002; Carreau et al., 2012). Estas respuestas rápidas son mediadas principalmente por receptores de estrógenos no-nucleares, los que se encuentran en la membrana plasmática, entre ellos podemos mencionar: el receptor de 7 regiones transmembrana, GPR30 (Carreau

et al., 2012), el ER no clásico, ncmER (Quesada et al., 2002) y el receptor GPER, que se encuentra en espermatozoides (Carreau et al., 2012).

Lo anterior muestra que los estrógenos también participan de la espermatogénesis, y que su desregulación puede provocar alteraciones que conllevan a la infertilidad. De esta forma, cualquier compuesto que afecta la regulación o los niveles de estrógenos en el tracto reproductor masculino podría generar efectos negativos en la espermatogénesis, como es el caso de los xenoestrógenos, que fueron descritos previamente.

La espermatogénesis puede dividirse en distintos estadios; 14 para la rata, 12 para el ratón y 6 para el humano. Cada uno de estos estadios corresponde a la agrupación de distintos tipos celulares en un momento y lugar determinado del túbulo seminífero, otorgando una propiedad segmentada a lo largo del túbulo seminífero, dado que los espermatozoides son liberados solo en algunos de estos estadios, específicamente en el estadio VIII en la rata, momento en que el espermatozoide es liberado desde el epitelio seminífero, en un proceso llamado espermiación (Hermo et al., 2010a). La producción final de espermatozoides es un balance entre la velocidad con que ocurre la espermatogénesis y la tasa de muerte de células germinales durante este proceso. En este sentido, la apoptosis cumple un papel fundamental en la regulación final del número de espermatozoides que se producen diariamente. La apoptosis afecta principalmente a los espermatocitos y espermatogonias en etapas XII y XIV en las ratas y, X y XII en los ratones (Oakberg, 1956; Billig et al., 1995). La importancia de la apoptosis en condiciones fisiológicas se muestra en experimentos donde la inhibición de este proceso genera una detención de la espermatogénesis e infertilidad (Knudson et al., 1995), probablemente por una sobrepoblación de células en estadios específicos de diferenciación. Por otra parte, un incremento en la apoptosis de células germinales genera una disminución en la producción

diaria de espermatozoides en humanos, lo que se ha reportado en pacientes oligo o azoospermicos (Kim et al., 2007). Por lo tanto, la apoptosis es fundamental en el control de la producción diaria de espermatozoides.

## **1.2. Mecanismos básicos de apoptosis en la espermatogénesis**

La apoptosis es un proceso de muerte celular dependiente de la activación de proteasas de cisteína, llamadas caspasas (Taylor et al., 2008). En general, existen dos vías para inducir muerte celular: extrínseca e intrínseca. La primera implica la activación de receptores de muerte como Fas/APO1/CD95 o TRAIL-R1 y R2, por su ligando putativo, FasL (Fas ligand), o TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), respectivamente. Una vez activados, estos receptores desencadenan una cascada de señalización que activa la caspasa-8 y caspasa-10, y que a su vez activan la caspasa-3 y/o de la caspasa-7, terminando en apoptosis. La caspasa-3 también puede ser activada por una vía alternativa por el ingreso de granzime-B a la célula blanco desde los linfocitos T y *natural killers* (Taylor et al., 2008; Tripathi et al., 2009). La vía intrínseca, a su vez, se activa principalmente por daños en el ADN, el estrés oxidativo o mal plegamiento de proteínas, que promueven la expresión y activación de proteínas pro-apoptóticas que pertenecen a la familia Bcl-2, incluyendo Bax, Bak y Bid (Sola et al., 2007; Taylor et al., 2008). Estas proteínas promueven la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo-c, junto a otras proteínas pro-apoptóticas, desde la mitocondria al citoplasma (Sola et al., 2007; Taylor et al., 2008). El citocromo-c, junto a la proteína citosólica Apaf-1, la pro-caspasa-9 y dATP forman un complejo llamado apoptosoma, que en última instancia activa la caspasa-3 (Sola et al., 2007; Taylor et al., 2008). Ambas vías convergen en la activación de caspasa-3, que es responsable de la proteólisis de proteínas tales como

poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y la activación de la desoxiribonucleasa dependiente de caspasa (CAD), lo que conduce a la fragmentación del ADN y a las características morfológicas de la apoptosis; compactación y *blebbing* de la célula, llevando a la formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células vecinas (Wang et al., 2006; Sola et al., 2007; Taylor et al., 2008).

En el caso de la espermatogénesis, durante la apoptosis fisiológica, que es aquella apoptosis observada en el tejido normal se ha observado, la activación de las caspasas-8, -9 y -3, junto con un aumento de proteínas pro-apoptóticas como, PUMA, BAX y el receptor Fas (Moreno et al., 2006; Lizama et al., 2007; Codelia et al., 2008), lo que sugiere la activación de la vía extrínseca e intrínseca. Sin embargo, la inhibición de la apoptosis intrínseca mediante la ablación de las proteínas proapoptóticas, BAX y BIM, produce infertilidad en ratones (Knudson et al., 1995; Hutcheson et al., 2005), demostrando que la acumulación anormal de células germinales es nociva para este proceso.

### **1.3. Apoptosis inducida en la espermatogénesis**

La espermatogénesis está sometida constantemente a efectos externos distintos a los xenoestrógenos que también inducen efectos negativos en este proceso como lo son la temperatura, compuestos genotóxicos y radiación, entre otras (Wang et al., 2008; Lizama et al., 2009; Codelia et al., 2010; Kanter et al., 2010; Lizama et al., 2011; Vergara et al., 2011; Bustamante-Marin et al., 2012; Lagos-Cabre and Moreno, 2012b; Lizama et al., 2012; Reyes et al., 2012). Debido a que la espermatogénesis es un proceso dependiente de temperatura, cambios en esta pueden inducir apoptosis, principalmente mediante el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROs) y de nitrógeno (RNs) por parte de

las mitocondrias con temperaturas escrotales por sobre los 33°C (Pino et al., 2013), además se observa un aumento de enzimas antioxidantes en células de Sertoli, sugiriendo un aumento de los niveles de ROSs después de la exposición a 43°C (Paul et al., 2009). También se activan vías de señalización que se observan principalmente en situaciones de hipoxia, como el aumento del mensajero de HIF1- $\alpha$  después de 6 horas de un tratamiento de 30 minutos a 40°C (Paul et al., 2009). Un aumento de la temperatura escrotal a 43°C por sólo 15 minutos induce la activación de calpaínas, proteínas dependientes de Ca<sup>2+</sup> involucradas en muerte celular y activación de p38<sup>MAPK</sup> (Lizama et al., 2009), así como daños del DNA de células germinales que tienen consecuencias en la formación de embriones en la siguiente generación, afectando a la descendencia y a la fertilidad de ratas expuestas a estos tratamientos (Paul et al., 2008). Las principales células que entran en el proceso apoptótico corresponden a espermatoцитos, los que se detectan por ubicación en el túbulo seminífero y por aislación mediante gradientes de BSA (Paul et al., 2008; Lizama et al., 2009; Pino et al., 2013).

La aplicación de compuestos genotóxicos como el etoposide, que es un droga anticancerígena utilizada principalmente contra el cáncer testicular, provoca efectos negativos en la supervivencia de células germinales en el testículo de rata, por ejemplo, se detecta un aumento considerable de la muerte celular, junto con aumentos en los niveles de caspasa-3, 8 y 9, junto con aumentos en los niveles de la p53 y de la proteína proapoptótica BAD (Ortiz et al., 2009), al reducir la p53 mediante el uso de RNA de interferencia contra esta y contra la p73, se observa una reducción significativa de la muerte inducida por etoposide en células GC-2, mientras que la aplicación *in vivo* de pifitrina, reduce la muerte de células germinales en presencia de etoposide (Codelia et al., 2010), sugiriendo a p73 y p53 como vías involucradas en la muerte inducida por compuestos genotóxicos como el

etoposide. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos determinado que las proteínas ADAM10 y ADAM17 participan de la inducción de apoptosis en presencia de etoposide, y no de temperatura, en testículos de rata, y que estas enzimas están río debajo de la activación de la p73 previamente estudiada (Lizama et al., 2012).

La radiación ionizante es un conocido inductor de mutaciones en células germinales, además de provocar efectos negativos en ellas como la inducción de apoptosis, la cual es fácilmente detectada después de la aplicación de 10 Gy de radiación gamma, mediante la técnica de TUNEL, pudiendo ser reducida mediante la aplicación de L-carnitina, un aminoácido con propiedades antioxidantes (Kanter et al., 2010), sugiriendo que la radiación también induce apoptosis mediante la generación de ROSs. También se observa una desestabilización de la barrera hematotesticular después de la aplicación de radiación electromagnética (Hou et al., 2012). Mediante el uso de radiación gamma se determinó que algunas vías involucradas en la muerte de espermatogonias corresponden a TRAIL, receptor de muerte relacionado con Fas, y PUMA, una proteína proapoptótica de la familia BCL-2, las cuales son inducidas después de 12 horas de la exposición a la radiación gamma mediante p53 (Coureuil et al., 2010).

La información recién expuesta ejemplifica la cantidad de factores externos a los que la espermatogénesis se ve sometida diariamente. Uno de los factores externos a la que la mayoría de las personas nos vemos expuesto es el de los xenoestrógenos. A continuación explicaremos el rol de los xenoestrógenos sobre la muerte de células germinales y la forma en que ello ocurre.

#### **1.4. Los xenoestrógenos como inductores de apoptosis en células germinales**

Los xenoestrógenos inducen muerte celular en células germinales masculinas, pero el mecanismo utilizado por estos compuestos es aún desconocido. Una disminución del número de células de Leydig y de los niveles plasmáticos de testosterona (T) se producen al tratar ratas adultas por vía oral con 160-960 mg/kg BPA durante dos semanas (Li et al., 2009). Las células de Leydig son células somáticas dentro del testículo que proveen andrógenos (principalmente T) que generan y mantienen la espermatogénesis y las características sexuales secundarias en el hombre (O'Donnell et al., 2001). El mismo efecto sobre los niveles hormonales de T es observado en ratas prepuberales inyectadas dos veces por semana con 200 mg/kg de BPA durante 6 semanas (Nakamura et al., 2010). Además, se encontró una reducción del metabolismo de colesterol por parte de las células de Leydig y una reducción de los niveles plasmáticos de la hormona luteinizante (LH), sugiriendo que BPA puede afectar la hipófisis, ya que una inyección de concentración menor de BPA (100 mg/kg) solo produce una disminución en los niveles de T, pero no de LH (Nakamura et al., 2010). Sin embargo, ratas y ratones adultos tratados con 20-200 µg/kg BPA por seis días, solo muestran anomalías en las especializaciones ectoplasmicas (ES, por las siglas en inglés) en las espermátidas elongadas, sin encontrarse cambios en las células de Sertoli o Leydig (Toyama et al., 2004). Las ES son uniones adherentes entre espermátidas elongadas y células de Sertoli, cuya estabilidad depende de los niveles de T (Wong et al., 2005; Ruwanpura et al., 2010). La aplicación de estradiol (E2) también reduce la estabilidad de ES mediante la reducción de los niveles de T (Wong et al., 2005); Por lo tanto, es posible que la aplicación de BPA imite el efecto estrogénico de E2 y desestabilice las ES entre espermátidas y células de Sertoli. (Lagos-Cabre and Moreno, 2012a)

El BPA aumenta los niveles de Fas y FasL en células germinales y de Sertoli, respectivamente, lo que ocurre acompañado de la activación de caspasa-3 en células germinales y de Leydig cuando se aplica BPA por *gavage* en ratas prepuberales (Li et al., 2009). La administración de 1,2-10  $\mu\text{g}/\text{día}$  BPA por cinco días a ratas macho recién nacidas reduce el conteo y motilidad espermática en la adultez, acompañado por una reducción en la tasa de apareamiento y de desprendimiento de células germinales desde el epitelio seminífero (Salian et al., 2009), mostrando los efectos a largo plazo de estos xenoestrógenos. El mismo estudio revela que ratas hembra apareadas con machos expuestos a BPA al nacer, muestran una disminución del número de embriones implantados (Salian et al., 2009).

Ratas macho, cuyas madres fueron expuestas a BPA mediante un implante antes del apareamiento hasta cuatro semanas después del nacimiento de las crías (destete), muestran un aumento en los niveles de T plasmática con concentraciones bajas de BPA (1,2  $\mu\text{g}/\text{día}$ ), pero un aumento en el mismo parámetro cuando se aplican concentraciones altas de BPA (60  $\mu\text{g}/\text{día}$ ), junto con un desprendimiento de células germinales y una reducción del número de túbulos seminíferos que contienen espermátidas elongadas (Okada and Kai, 2008). Algo similar se observa en ratones prepuberales tratados con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BPA en el agua de beber, detectándose una reducción de los niveles de T y encontrándose células germinales multinucleadas (Takao et al., 1999).

El DEHP y su metabolito MEHP producen una depleción de los gonocitos (futuras espermatogonias) en testículos de ratas fetales, acompañado de una reducción de los niveles de T (Chauvigne et al., 2009). Estos efectos también son observados en testículos de fetos humanos, pero sin observarse una reducción de los niveles de T (Lambrot et al.,

2009). Ambos trabajos muestran que las células de Sertoli no son afectadas por estos xenoestrógenos. Sin embargo, cabe mencionar que sólo en los testículos de fetos humanos se observó que las células de Leydig siguen activas.

Las células de Sertoli parecen ser resistentes al daño provocado por los xenoestrógenos, ya que *in vitro* sólo entran en apoptosis al ser expuestas a altas concentraciones de xenoestrógenos (Gong and Han, 2006; Gong et al., 2008; Li et al., 2009; Lizama et al., 2009). Si las células de Sertoli no entran en apoptosis inducida por los xenoestrógenos, es posible que su metabolismo o propiedades biofísicas se vean afectadas por los xenoestrógenos, de forma que manifiesten apoptosis y las células germinales se desprendan (Lagos-Cabre and Moreno, 2012a).

Una dosis única de 2 g/kg MEHP aplicada por *gavage* a ratas prepuberales desestabiliza los filamentos de vimentina en células de Sertoli y activa la apoptosis en células germinales, evidenciado por TUNEL y fragmentación de DNA, 12 horas después de la aplicación (Richburg and Boekelheide, 1996). Ratones prepuberales tratados con 1 g/kg MEHP muestran un incremento de los niveles de FasL y TNF- $\alpha$  tan solo 1,5 horas después de la aplicación (Yao et al., 2007), demostrando que estos compuestos actúan de manera rápida, y probablemente, de forma no genómica. El mismo trabajo muestra un incremento de FasL a nivel de RNA mensajero y de proteínas en cultivos primarios y líneas celulares derivadas de células de Sertoli, que es similar al efecto observado utilizando BPA (Li et al., 2009), sugiriendo que el aumento en los niveles de FasL podría ser una respuesta común después de la administración de los xenoestrógenos.

Los ratones *gld* poseen una mutación inactivante de FasL y muestran una respuesta aminorada del efecto apoptótico inducido por MEHP, demostrando la importancia de FasL en la muerte celular inducida por este xenoestrógeno (Richburg et al., 2000). De forma similar, ratones *FasL<sup>-/-</sup>* tratados con 1 g/kg de MEHP muestran una reducción en la muerte celular por apoptosis cuando se comparan con ratones *wild type* (Lin et al., 2010).

En el caso del NP, la administración oral de este compuesto (1, 10 o 100 µg/kg/día) a ratas macho induce una disminución de los pesos testiculares y epididimales, así como una disminución del conteo espermático dentro del epidídimo (Chitra et al., 2002). El NP también produce una sobre regulación del sistema Fas-FasL cuando las ratas prepuberales son expuestas a 125, 250 y 300 mg/kg/día de NP por dos meses, observándose aumento del mRNA de Fas y FasL en los testículos, junto con un aumento de las células positivas para TUNEL (Han et al., 2004), de manera similar a lo observado con BPA y DEHP. Células de Sertoli en cultivo tratadas con concentraciones crecientes de NP (desde 0,1 a 40 µM) muestran un incremento en la muerte celular por apoptosis, aumento de la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  y permeabilidad y desestabilización de la membrana plasmática (Gong and Han, 2006; Gong et al., 2008), demostrando el efecto negativo sobre células de Sertoli en cultivo primario. El aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  observado después de la aplicación de NP, es en realidad, un efecto común en respuesta a los xenoestrógenos, y es, quizá, el efecto más estudiado de estos compuestos, observándose en células de Sertoli y otros modelos en cultivo (Hughes et al., 2000; Nadal et al., 2000; Quesada et al., 2002; Watson et al., 2005; Watson et al., 2007; Gong et al., 2008; Michelangeli et al., 2008). Sin embargo, aún hay controversia respecto a la vía de ingreso del  $Ca^{2+}$  a la célula cuando se aplican los xenoestrógenos.

Otra respuesta celular que es común a todos los xenoestrógenos es el aumento en la producción de ROSs, lo que puede gatillar apoptosis en células germinales (Gong and Han, 2006; Gong et al., 2008). El NP produce estrés oxidativo en cultivos de células TM4, que son líneas celulares de células de Sertoli de ratón (Gong and Han, 2006; Gong et al., 2008). Ratas machos tratadas con diferentes concentraciones de NP muestran un aumento de la producción de ROSs y una disminución de en la actividad de las enzimas antioxidante (Chitra et al., 2002). El DEHP y el MEHP, incrementan la producción de ROSs en el testículo y en células germinales y de Sertoli aisladas, junto con un aumento de la fragmentación de DNA (indicio de apoptosis) (Kasahara et al., 2002), lo que también ocurre en la línea celular de células de Leydig, MA-10 (Erkekoglu et al., 2010). También se ha observado que la aplicación de BPA, NP y octilfenol (OP), otro xenoestrógeno, incrementa el daño oxidativo en el testículo de rata cuando estas son tratadas con cada uno de los xenoestrógenos por 45 días (Aydogan et al., 2010), sugiriendo que los xenoestrógenos pueden actuar a través de un mecanismo oxidativo para producir apoptosis de células germinales, el que puede ser producido mediante un estrés mitocondrial o de retículo endoplasmático. Esta hipótesis es corroborada por los experimentos hechos en células de Sertoli en cultivo, en los cuales se demuestra que NP produce un incremento de la producción de ROSs evaluada por la peroxidación de lípidos y una disminución del potencial de membrana mitocondrial (Gong and Han, 2006), todas pruebas de un aumento del estrés oxidativo. El estrés oxidativo está directamente relacionado con apoptosis de células germinales en testículos de rata, ya que un aumento en la producción de ROSs, o en la disminución de enzimas antioxidantes, produce un aumento significativo en la muerte celular (Chitra et al., 2002; Kasahara et al., 2002; Gong and Han, 2006; Gong et al., 2008; Paul et al., 2009).

Si bien se conocen los efectos negativos de estos compuestos, es muy poco lo que se sabe del mecanismo de acción de ellos. En este sentido, recientemente se estudió la participación de la enzima MMP2 (*matrix metalloprotease 2*) en la apoptosis de células germinales después de la aplicación de MEHP (Yao et al., 2009). En el mismo estudio se describe un aumento temprano de las ADAM10 y ADAM17 (*A-Disintegrin And Metalloprotease 10 and 17*), dos de las proteínas de la familia ADAM más importantes y bien estudiadas en distintos procesos celulares, que también participan en la apoptosis de células germinales *in vivo* e *in vitro* inducida por etopósido o de manera fisiológica (Lizama et al., 2010b; Lizama et al., 2011). Estos resultados indican una sobreposición en los mecanismos que inducen muerte fisiológica, por genotóxicos y probablemente por xenoestrógenos.

### **1.5. Las metaloproteasas de la familia ADAM como posibles inductoras de apoptosis**

Las proteínas ADAMs constituyen una familia de proteasas extracelulares que participan en la liberación de ectodominios de muchas proteínas desde la superficie celular, incluyendo: TNF- $\alpha$ , c-kit, FasL, Notch, APP y TrkA, entre otros, lo que indica un importante papel en señalización autocrina, paracrina y yuxta/paracrina (Schlondorff and Blobel, 1999; White, 2003). Se sabe que la ADAM17 es regulada por quinasas de la familia MAPK (Chen et al., 2010; Killock and Ivetic, 2010), las que afectan su actividad y localización celular. Una proteína ADAM “típica” presenta un prodominio inhibitorio, un dominio metaloproteasa, un dominio desintegrina, un dominio tipo EGF, un dominio rico en cisteína, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (Schlondorff and Blobel, 1999; White, 2003; Edwards et al., 2008; Moreno et al., 2011). Sin embargo, solo el 60%

de las ADAMs posee actividad catalítica gracias a su dominio metaloproteasa. Para que una proteína ADAM se active, se requiere la remoción de su prodominio (de unos 20 kDa), el cual mantiene la proteína inactiva y favorece su tráfico intracelular. Este prodominio puede ser removido por proteínas convertasas (por ejemplo, furina) o por medio de una auto-activación, donde la misma proteína puede remover su prodominio (ADAM8 y ADAM28) (Schlondorff and Blobel, 1999; White, 2003; Edwards et al., 2008; Moreno et al., 2011). Los dominios desintegrina, tipo EGF y ricos en cisteínas son principalmente para adhesión a otras células y reconocimiento de sustrato (Schlondorff and Blobel, 1999; White, 2003; Edwards et al., 2008; Moreno et al., 2011). Sin embargo, el dominio rico en cisteínas también parece jugar un rol en la activación de algunas ADAMs (ADAM17 y ADAM13, principalmente) (Reddy et al., 2000; Smith et al., 2002). Por último, la cola citoplasmática presenta diversos sitios de fosforilación y anclaje de otras proteínas, por lo que se supone que juega un rol regulatorio. Sin embargo, se ha demostrado que su presencia no es importante para la actividad de la ADAM17 en condiciones experimentales (Reddy et al., 2000; Moreno et al., 2011; Hall and Blobel, 2012). Por otro lado, existen datos que avalan un papel importante del dominio intracelular en la regulación de ADAM17, en este sentido se ha propuesto que la fosfatasa PTPH1 (*protein tyrosine phosphatase*) participa en la inhibición de esta enzima (Zheng et al., 2002). Más aún, se ha observado que la ADAM17 puede ser activada por diversas vías, las que incluyen; PKC $\delta$ , ERK1/2 y p38<sup>MAPK</sup> (Diaz-Rodriguez et al., 2002; Soond et al., 2005; Killock and Ivetic, 2010; Moreno et al., 2011). p38<sup>MAPK</sup> promueve la activación de la ADAM17, debido a que promueve su localización en membrana plasmática y la fosforilación de su cola citoplasmática en el residuo treonina 735 (Soond et al., 2005; Killock and Ivetic, 2010; Hall and Blobel, 2012). Este dato cobra mayor relevancia en el contexto que p38<sup>MAPK</sup> es una quinasa que se activa en respuesta a un aumento en la especies reactivas de oxígeno,

una condición que ocurre en el testículo de rata expuesto a xenoestrógenos (Liu and Chang, 2009; Kim et al., 2010; Lee and Lim, 2010; Lizama et al., 2010b). Por otro lado, un aumento en las ROSs por si solo promueve la activación de la ADAM17 lo que refuerza un posible vínculo entre el estrés oxidativo y la activación de esta enzima (Fischer et al., 2004; Shao and Nadel, 2005; Myers et al., 2009), También mencionamos anteriormente que una respuesta común a la aplicación de xenoestrógenos es el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En este sentido, se ha evaluado que la ADAM17 puede ser activada por un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la generación de ROS activada por este aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Shao and Nadel, 2005; Myers et al., 2009), de la misma forma, se ha estudiado que la ADAM17 puede ser activada por un ingreso de  $Ca^{2+}$  en respuesta a la activación de receptores  $P2Y_2$  en células de astrocitoma (Camden et al., 2005), lo que nos permite pensar que estas vías, aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , producción de ROSs y activación de  $p38^{MAPK}$  pueden estar implicadas en activación de la ADAM17 en respuesta a xenoestrógenos.

En esta tesis se plantea dilucidar la participación de la proteína ADAM17 en la inducción de apoptosis inducida por BPA y NP en las células germinales, proponiendo esta metaloproteasa como un nuevo componente molecular del mecanismo responsable de los efectos negativos de los xenoestrógenos.

## **2. Planteamiento del problema:**

Si bien se sabe que los xenoestrógenos inducen una alteración de la fisiología del testículo no existe un mecanismo que explique la apoptosis masiva de células germinales observada en machos expuestos a estos tóxicos. Más aún, no hay datos de los efectos de BPA o NP en la apoptosis de células germinales durante la pubertad, que es donde los xenoestrógenos causan sus mayores efectos: ¿Qué mecanismo de acción está involucrado en la respuesta a los xenoestrógenos en el testículo? La información recopilada nos hace pensar que la ADAM17 podría cumplir un papel importante en la muerte celular inducida por xenoestrógenos, por lo que se desea esclarecer si esta metaloproteasa forma parte de la vía de acción de estos compuestos, y de esta forma dar un nuevo rol a esta enzima en respuesta a estímulos ambientales como los xenoestrógenos.

### 3. Hipótesis

Los xenoestrógenos, BPA y NP, afectan negativamente la espermatogénesis a través de un mecanismo que involucra la participación de la ADAM17,  $[Ca^{2+}]_i$ , p38<sup>MAPK</sup> y ROSs.

### 4. Objetivo general

El objetivo general es determinar las vías implicadas en la muerte de células germinales ante la exposición a xenoestrógenos.

#### 4.1. Objetivos específicos

1. Establecer si la inhibición de la ADAM17 previene la apoptosis de células germinales inducida por BPA y/o NP en testículos de rata.
  - a. Cuantificar la apoptosis de células germinales en el testículo de rata prepuberal de 21 días ante la inyección intraperitoneal de BPA y/o NP.
  - b. Determinar si la inhibición de la ADAM17 previene la apoptosis de células germinales inducida por BPA y/o NP.
  - c. Determinar si la inhibición de otro miembro de la familia ADAM previene la apoptosis de células germinales inducida por BPA y/o NP.
2. Evaluar si los xenoestrógenos BPA y NP alteran la expresión y/o localización de la ADAM17 en el testículo de rata.
  - a. Estudiar si BPA y/o NP alteran la localización de la ADAM17 en testículos de rata.
  - b. Determinar si BPA y/o NP regulan los niveles de la ADAM17 a nivel proteico en testículos de rata.
  - c. Determinar si BPA y/o NP regulan los niveles de la ADAM17 a nivel de mRNA en testículos de rata.

3. Determinar si p38MAPK participa en la apoptosis dependiente de la ADAM17 inducida por BPA y NP.
  - a. Determinar si la presencia de BPA y NP afectan los niveles de p38<sup>MAPK</sup>, y su regulador ASK1 en testículos de rata.
  - b. Evaluar si la inhibición farmacológica de p38<sup>MAPK</sup> previene la apoptosis inducida por BPA o NP.
  - c. Estudiar si la inhibición farmacológica de p38<sup>MAPK</sup> previene la activación de la ADAM17.
4. Establecer si el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  provocado por BPA y NP regula los niveles y la activación/maduración de la ADAM17.
  - a. Evaluar si el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  produce activación de la ADAM17.
  - b. Evaluar si los niveles y/o actividad de las ADAM17 se alteran en presencia de BPA y NP en un medio sin  $Ca^{2+}$  extracelular.
  - c. Cuantificar posibles cambios en los niveles proteicos de la ADAM17
  - d. Cuantificar la liberación al medio de ectodominios de TNF- $\alpha$  mediado por BPA y NP en presencia y ausencia de  $Ca^{2+}$  intracelular.

## 5. Materiales y métodos

### Animales

Ratas macho Sprague-Dawley de 21 días de edad, fueron adquiridas del Bioterio central de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las ratas 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).

### Administración de los xenoestrógenos

Después de tomar el peso promedio de las ratas, se inyectaron intraperitonealmente (ip) distintas dosis de cada xenoestrógeno (BPA, Sigma, o NP, Supelco-Sigma), los que fueron disueltos en etanol para obtener las soluciones stock. Para inyectar, alícuotas de las soluciones stocks se diluyeron en aceite de oliva. Como vehículo se utilizó etanol disuelto en aceite de oliva. Después de esperar el tiempo establecido para cada experimento se procedió a sacrificar las ratas para la extracción de muestras.

### Inyecciones intratesticulares

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina:xilazina (1 mg/kg: 750 mg/kg) intraperitoneal. Los testículos fueron exteriorizados a través de una incisión en la línea media baja del

abdomen. Diez micro-litros de una solución que contenía 10  $\mu$ M GW280264X (inhibidor de ADAM17-ADAM10), GI254023X (inhibidor de ADAM10) y/o 5  $\mu$ M PD169316 (inhibidor de la p38) fue infundida a través de una aguja 30G insertada a través de la túnica albugínea con la punta descansando en el intersticio testicular. Las concentraciones de inhibidores se basan en estudios previos que demuestran que no son tóxicos a estas concentraciones y que previenen la apoptosis inducida por estrés térmico y PMA (Lizama et al., 2009; Lizama et al., 2010b). Tras la administración de los fármacos, los testículos fueron devueltos hasta el peritoneo y la incisión fue cerrada. Las ratas fueron sacrificadas en los tiempos indicados después de la inyección. Como vehículo se usó etanol (en la misma dilución que las drogas) diluido en PBS estéril. Al menos tres ratas fueron utilizadas por experimento.

#### Extracción de proteínas y análisis de *western blot*

La extracción de proteínas se realizó con la homogeneización del testículo decapsulado y células de los testículos aisladas en un tampón que contenía 1M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mg/ml PMSF, 1% Tritón X-100, 20 mM Tris-HCl pH 7,4. La muestra fue sonicada y centrifugada durante 10 minutos a 10.000 rpm. Después, las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) en condiciones denaturantes, y luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA durante 1 hora. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con una solución que contenía 3% (p/v) de leche descremada y 0,1% de Tween en PBS, pH 7,4 por 1 hora. Después la membrana se incubó durante la noche a 4°C con alguno de los anticuerpos descritos en la Tabla 1. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (KPL, Gaithersburg,

MD) diluida 1:6000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, y la reacción fue detectada por ECL (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

**Tabla 1: Lista de anticuerpos, dilución, concentración del stock y marca de aquellos usados en esta tesis.**

Anticuerpo	Dilución	Concentración	Marca
Anti ADAM 17 total	1:1.000 (WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti ADAM 10 total	1:1.000 (WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti ADAM 9 total	1:1.000 (.WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti clusterin	1:1.000 (WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti SCP3	1:1.000 (WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti Fas	1:1.000 (WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti FasL	1:1.000 (WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti PARP	1:5.000 (WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti c-kit	1:1.000 (WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti p38 total	1:1.000 (WB)	0,2 mg/mL	Santa Cruz biotech.
Anti vimentina	1:1.000 (WB)	0,2 mg/mL	Neo Markers (Lab Vision)
Anti ADAM17 activa	1:5.000 (WB) 1:200 (IHQ)	1 mg/mL	Abcam
Anti MDA	1:1.000 (WB) 1:200 (IHQ)	1 mg/mL	Abcam
Anti nitro-tirosina	1:1.000 (WB) 1:200 (IHQ)	1 mg/mL	Abcam
Anti p38 (pThr180/Tyr182)	1:3.000 (WB)	1 mg/mL	Abcam
Anti pannexina 1	1:500-1:1000 (WB) 1:200 (IF)	0,5 mg/mL	R&D Systems
Anti pannexina 2	1:1000 (WB) 1:200 (IF)	0,2 mg/ml	Diatheva
Anti pannexina 3	1:500-1:1000 (WB) 1:200 (IF)	0,25 mg/mL	Invitrogen
Anti caspasa-3 activa (Asp175)	1:200 (IHQ)	N.D.	Cell Signaling
Anti $\beta$ -actina	1:5000 (WB)	0,3 mg/mL	Sigma
Anti $\alpha$ -tubulina	1:5000 (WB)	1 mg/mL	Sigma

## Histología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Los testículos de rata 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  $\mu\text{m}$  de espesor y se montaron en portaobjetos silanizados. Los cortes fueron des-parafinados través de una batería de alcohol-xilol. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina/eosina, de acuerdo con el procedimiento estándar. Los cortes fueron observados con un microscopio Olympus BH-2 (Olympus, Tokio, Japón). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital Nikon modelo Coolpix 4500 (Nikon, Tokio, Japón). Las inmunohistoquímicas contra caspasa-3 activa (1:200), ADAM10 y 17 (1:200) fueron realizadas en los cortes previamente descritos, los cuales fueron tratados con citrato de sodio 0,01 M y pH 6, para exposición de antígeno. Luego, los cortes fueron bloqueados con peróxido de hidrógeno por 10 minutos y *ultra V-Block* por otros 10 min (LabVision, Freemont, VA). El revelado de estas inmunohistoquímicas fue realizado por un *kit* de detección para inmunohistoquímica (LabVision, Freemont, VA). En el caso de las inmunofluorescencias. Luego de la des-parafinación, los cortes fueron bloqueados por 1 hora en una solución de TBS-Tween 0,1% / BSA 3%, tras lo cual el anticuerpo primario fue agregado a una dilución de 1:200 e incubado durante toda la noche a 4°C. Luego, los cortes fueron lavados e incubados con el anticuerpo secundario acoplado a FITC o TRITC, ambos 1:200 por 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con TBS-Tween 0,1% las muestras fueron incubadas por 5 minutos en una solución de 10  $\mu\text{M}$  ioduro de propidio. Los cortes fueron montados en Fluoromount (Sigma, USA) y mantenidos en frío hasta su observación.

## Análisis de TUNEL

La fragmentación del ADN se evaluó mediante análisis de TUNEL en secciones de testículos de ratas. Se utilizó un *kit* TUNEL promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus CKX41, Tokyo, Japón) y micrografías fueron tomadas con una cámara digital (Coolpix 4500, Nikon). Las células germinales positivas para TUNEL, visualizadas como células fluorescentes verdes, se cuantificaron en cada sección de tejido al contar el número de células positivas por los túbulos seminíferos. Tres cortes histológicos testiculares fueron tomadas por rata (tres ratas en total), con un mínimo de 100 túbulos seleccionados al azar en cada sección de tejido (un total de 900 túbulos por tratamiento).

## Citometría de flujo y precipitación de células positivas para la ADAM17

Células intratubulares aisladas (es decir, células germinales y células de Sertoli) se obtuvieron de ratas de 21 días de edad tratadas previamente con 50 mg/kg BPA o NP por 24 horas. Las células fueron bloqueadas con DMEM F12 suplementado con 3% de BSA durante 1 hora. Los anticuerpos contra la ADAM17 se diluyeron 1:200 en la solución de bloqueo y se incubaron a 4° C durante la noche. Luego, las células se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a FITC durante 1 hora en la solución de bloqueo. Las células se lavaron 3 veces en PBS y se analizaron utilizando un clitómetro de flujo FascCANTO (BD bioscience). Todo el proceso anterior fue realizado en hielo. Para llevar a cabo las precipitaciones de células positivas para la ADAM17, las células testiculares se incubaron 4 horas en el medio DMEMF12 suplementado con 3% de BSA en el que fue diluido el anticuerpo anti-ADAM17 Santa Cruz biotechnology (1:200).

Luego, las células se lavaron tres veces en PBS y se incubaron con esferas de sefarosa acopladas con proteína A durante 30 minutos. Las células se precipitaron por medio de un *spin* rápido y se lavaron tres veces con PBS para eliminar las células ADAM17 negativas. El sobrenadante se recuperó y fue guardado en otro tubo, este contenía aquellas células ADAM17 negativas.

#### Aislación de células germinales

Los testículos son obtenidos de ratas Sprague-Dawley adultas de 250 g y decapsulados. Se digiere el tejido con colagenasa tipo I (5mg en 10 mL) y DNAsa (30 uL 10mg/mL) en medio KH (133 mM NaCl, 4,2 mM KCl, 1,6 mM Mg<sub>2</sub>Cl, 1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM de HEPES, 0,5 mM Ca<sub>2</sub>Cl y 5 mM lactato a pH 7,4)agitando por 20 minutos a 33°C para separar los túbulos seminíferos. Estos se lavaron 3 veces en KH para retirar las enzimas Se agregó tripsina (de páncreas bovino, Gibco, USA, 4 mg en 10 mL de KH) y DNAsa (30 uL 10 mg/mL) y agitar por 2 min a 33 °C para eliminar células mioides y luego los túbulos se disgregaron mecánicamente por trituración a través de una pipeta Pasteur. Finalmente, se agregó DNAsa (de páncreas bovino, 20 µL 10 mg/mL, Sigma, USA) y las células en suspensión se filtraron a través de mallas con poros de 140 y 70 µm de diámetro. Luego, las células filtradas se centrifugaron 3 minutos a 1.000 g y se lavaron 3 veces con medio KH centrifugando cada vez. Luego se resuspendieron en 7 mL de KH, se agregó DNAsa (20 uL) y se cargaron al gradiente discontinuo de BSA, el cual se prepara con soluciones de BSA en medio KH a dos concentraciones: 1,5% y 4%. Para esto, primero se cargaron las células en un mínimo volumen de BSA 1,5% en KH (aproximadamente 30 mL), luego se inicia el gradiente, mezclando las dos soluciones de BSA y añadiéndolas a un recipiente. Se dejó decantar y/o separó por 3 horas y luego se comenzó la extracción de las fracciones

mediante una salida en el fondo del recipiente. El flujo durante la recolección de las fracciones fue de 3mL/min aprox. Se recolectó todo el volumen (generalmente 70 fracciones) y se observaron las distintas fracciones. Los espermatoцитos en paquitenos se encontraron entre las fracciones 10-25, mientras que las espermátidas redondas estaban en las fracciones 40-60. El resto de las fracciones contenían mezclas de células germinales y de Sertoli. Las fracciones a estudiar se juntaron y se centrifugaron a 1.000 g por 3 min.

#### Aislamiento de células de Sertoli

Las células de Sertoli fueron obtenidas a partir de ratas Sprague-Dawley macho de 17 días de edad y fueron sacrificadas por dislocación cervical. Los testículos fueron extraídos, decapsulados y puestos en la solución utilizada para aislar túbulos seminíferos de rata adulta. Una vez aislados los túbulos seminíferos, se esperó que decanten y se lavaron 3 veces en PBS estéril para proceder a la disgregación mecánica utilizando 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 células fueron resuspendidas en una solución de PBS y agua destilada a 1:9, para generar un *shock* hipotónico, que destruye las células germinales pero no las de Sertoli. Entonces las células fueron filtradas nuevamente, centrifugadas y resuspendidas en medio DMEM-F12 incompleto con antibiótico. 24 horas después las células se lavaron y se cambió el medio por medio fresco. Se dejaron por un mínimo de 4 días, tras lo cual toda célula germinal desaparece y es fagocitada por las células de Sertoli y se obtiene un cultivo de una pureza superior al 90%.

### Medición de la $[Ca^{2+}]_i$ y captación de colorante utilizando metafluo

Las células fueron crecidas en cubreobjetos de 1 cm de diámetro, luego fueron lavadas 3 veces en PBS estéril y puestas en medio fresco conteniendo 5  $\mu$ M FURA2-AM por 30 minutos, tras lo cual las células fueron lavadas en PBS y mantenidas en medio Locke conteniendo (NaCl 130 mM,  $Ca_2Cl$  2,3 mM, KCl 5,6 mM, Hepes 8,4 mM,  $Mg_2Cl$  1 mM, glucosa 5,6 mM). Después, las células fueron observadas bajo un microscopio Olympus BX 51WII con objetivos de inmersión en agua y las imágenes obtenidas mediante una cámara monocromática Retga 1300I fast-cooled (12-bit) (Qimaging, Burnaby, BC, Canada), y los datos analizados con el programa METAFLUOR software (Universal Imaging, Downingtown, PA). Las imágenes fueron obtenidas durante el tiempo especificado, tomando una imagen cada 3 segundos y entregando la razón de las mediciones de la razón 340/380 nm, la que corresponde a la señal de FURA2. Los resultados fueron graficados mostrando la señal de fura del promedio total de células analizadas por cada tratamiento (40 células) y el área bajo la curva, la cual se calcula usando como basal el primer minuto de captación, o tomando un basal fijo, según corresponda.

La captación de colorante se realizó en las mismas condiciones, pero utilizando medio Locke cargado con 5  $\mu$ M bromuro de etidio, el cual se mantuvo durante toda la captación. Las células previamente fueron incubadas por el tiempo correspondiente en presencia de xenoestrógenos, tras lo cual fueron lavadas y puestas en medio Locke con bromuro de etidio, se tomaron imágenes cada 3 segundos durante 20 minutos; los 10 minutos iniciales sirvieron para determinar el efecto de los tratamientos y los 10 restantes para observar el efecto del bloqueo de los hemicanales. Los resultados fueron graficados obteniendo el aumento de la fluorescencia de bromuro de etidio en el tiempo mediante el programa

Image J (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), tras lo cual se calcularon las pendientes de captación antes y después de los bloqueadores, además se cuantifica el número de células que captan colorante.

Medición fluorométrica de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

Las células fueron incubadas en medio KH (germinales) o Locke (Sertoli) y FURA2-AM por 45 minutos, tras lo cual fueron lavadas y puestas a una concentración de  $4,5 \times 10^6$  células en 2,5 mL de medio KH en una cubeta de plástico con un agitador magnético que permite que las células no decanten. Las mediciones fueron hechas en un fluorímetro Fluoromax-2 (Jobin Ivon-Spex, Edison, NJ). Los tratamientos especificados en cada tratamiento fueron agregados directamente a la cubeta en un volumen no mayor a 20  $\mu$ L.

Transfección de células

La línea celular LnCap fueron transfectadas con el plásmido (AP)-NRG  $\beta$ 1. Para esto, las células se sembraron a 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 suplementado con 10% de FBS y 10% de antibiótico antimicótico (100X). Para evaluar si las líneas celulares introdujeron el plásmido (AP)-NRG  $\beta$ 1, 24 horas después de realizada la transfección se evaluó la presencia del mensajero de neuregulina  $\beta$ 1 en las células transfectadas y controles, mediante la técnica de RT-PCR. 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 plásmido (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 líneas celulares transfectadas

Cultivos celulares (con un 90% de confluencia) de las líneas que hayan sido transfectadas fueron expuestas a diferentes concentraciones de BPA o NP a distintos tiempos. Posteriormente, el medio de las células tratadas y de los controles se utilizaron para evaluar la liberación de la enzima fosfatasa alcalina al medio de cultivo mediante la detección de la actividad de fosfatasa alcalina en el medio a través del *kit* p-NPP que contiene un sustrato de dicha enzima. La fosfatasa alcalina está acoplada a neuregulina, la cual es un sustrato de la ADAM17, esta última, al escindir el ectodominio de neuregulina libera fosfatasa alcalina al medio, la cual es detectada por el ensayo espectrofotométrico.

#### Medición de TNF- $\alpha$

La medición de la liberación de TNF- $\alpha$  fue hecha utilizando kits comerciales *TNF- $\alpha$  Rat ELISA Kit* y *TNF- $\alpha$  mouse ELISA Kit*. Brevemente. Las células expuestas a los distintos tratamientos fueron incubadas por el tiempo establecido, para luego extraer el medio de cultivo. Este fue centrifugado a 1.000 g para eliminar restos celulares. El medio de cultivo fue diluido en el tampón de dilución estándar e incubado en una placa de 96 pocillos que está recubierta con anticuerpo contra TNF- $\alpha$  de rata o ratón, respectivamente. Luego se

lavó y se agregó un anticuerpo secundario acoplado a biotina, seguido de la adición de estreptavidina acoplada a peroxidasa, la que se hará reaccionar con un sustrato específico que genera color y el producto de reacción se midió en un lector de placas de ELISA a 450 nm. Los resultados fueron comparados con una curva de calibración de la concentración de TNF- $\alpha$ .

#### Extracción de RNA y RT-PCR

El RNA fue extraído usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. El RNA total fue cuantificado y luego se determinó su integridad en un gel de agarosa al 1%.

Para generar el cDNA, se transformaron 2  $\mu$ g de RNA de las mismas muestras, usando *random primers* (Invitrogen, Carlsbad, CA ) y *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega, USA). El cDNA obtenido fue amplificado por PCR por 30 ciclos usando *PCR master mix* (Promega, USA) en 25 $\mu$ l de volumen final de reacción. Varios pares de partidores se usaron para obtener productos de PCR para las distintas ADAMs estudiadas y su control de carga. Las alícuotas de producto de PCR fueron corridas en geles al 1% de agarosa/bromuro de etidio corridos a 80 V. Las bandas obtenidas fueron analizadas midiendo los pixeles y normalizadas con el nivel de mRNA de GAPDH.

Partidores específicos:

ADAM9

Fw: CAGACTGCTGTGAGAGAAG

Rv: CATTCCCTGCAGTTCCACCA

ADAM10

Fw: CCTACGAATGAAGAGGGAC

Rv: TCACAGCTTCTCGTGTTC

ADAM17

Fw: GTTGGTGAGCCTGACTCTA

Rv: CCTCTTGTGGAGACTTGAG

GAPDH

Fw: ACCACAGTCCATGCCATCAC

Rv: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Panx1

Fw: CAA GGG AGA GGA CCA GGG C

Rv: ATC TAT TCT TCT ATG ACG CTG

Panx2

Fw:GAG AAA AAG CAT ACC CGC CAC

Rv: GGG TGA GCA GAC ATG GAA TGA

Panx3

Fw: CCT CAC AAG GCT CTT CCC TA

Rv: AGG TCA GCC TGC ATG TGA TC

Análisis estadístico

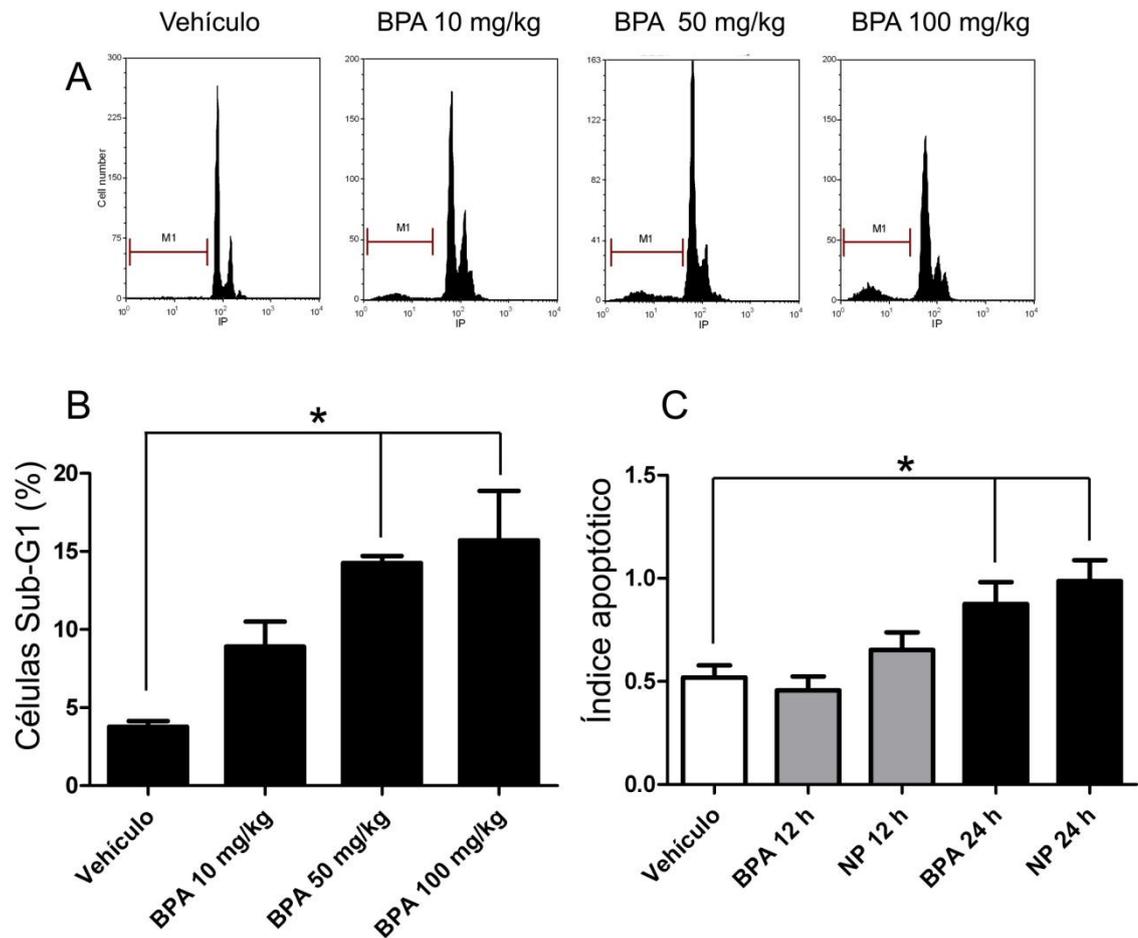
Nuestros experimentos fueron realizados con un mínimo de 3 experimentos independientes. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Graphpad 5, utilizando los análisis de ANOVA o t-student como test primario.

## 6. Resultados

### ***6.1. Establecer si la inhibición de las ADAMs10 o 17 previene la apoptosis de células germinales inducida por BPA y/o NP en testículos de rata de 21 días***

Como una primera aproximación se realizó una curva de dosis-respuesta para determinar la dosis a la que BPA induce apoptosis de células germinales en testículos de rata. Para ello se usaron ratas macho de 21 días de edad, las cuales fueron inyectadas intraperitonealmente con BPA diluido en aceite de oliva, y luego de 24 horas de este tratamiento se aislaron las células de los túbulos seminíferos y la apoptosis se evaluó por citometría de flujo cuantificando las células en la población SubG1 (células apoptóticas con DNA fragmentado y condensado, que aparecen con una cantidad de DNA inferior a las células de la población G1). Luego del tratamiento con las dos concentraciones más altas de BPA, 50 y 100 mg/kg, la población de células SubG1 aumentó significativamente en comparación con el vehículo, desde un  $3,77 \pm 0,37\%$  a un  $14,27 \pm 0,44\%$  para el caso de 50 mg/kg de BPA, y a un  $15,72 \pm 3,16\%$  en el caso de 100 mg/kg de BPA, no registrándose diferencias significativas entre las aplicaciones de 50 y 100 mg/kg de BPA. Con la aplicación de 10 mg/kg BPA sólo un  $8,92 \pm 1,60\%$  de las células intratubulares se encontraban en la población SubG1, lo que no es estadísticamente significativo en comparación con el control (Fig. 1A y 1B). Estos resultados indican que una aplicación aguda y de baja concentración de BPA (50 mg/kg) induce apoptosis *in vivo* en testículos de rata, a diferencia de otros autores que han utilizado altas concentraciones de xenoestrógenos y/o tiempos prolongados de exposición a ellos (Han et al., 2004; Toyama et al., 2004; McClusky et al., 2007; Li et al., 2009; Nakamura et al., 2010). Con estos resultados, escogimos los 50 mg/kg de BPA como la concentración que utilizaríamos en nuestros próximos experimentos tanto de BPA como de NP, ya que fue la concentración

más baja que indujo efectos observables (LOE, *low observable effects*). Posteriormente, evaluamos apoptosis por medio de la histología y se determinó el índice de apoptosis, que es el número de células apoptóticas por túbulo seminífero. Las células apoptóticas son fáciles de identificar por su forma esférica y apariencia picnótica (concentrada y oscura), y que son células positivas para TUNEL, es decir, poseen DNA fragmentado, uno de los últimos eventos de la apoptosis (Moreno et al., 2006), por lo tanto ofrecen una aproximación excelente para la detección de muerte celular por apoptosis en testículo. En el caso de los testículos de ratas tratadas con vehículo el índice apoptótico fue de  $0,52 \pm 0,06$  y luego del tratamiento con 50 mg/kg de BPA por 24 horas este parámetro aumentó significativamente a  $0,88 \pm 0,10$ , y a un  $0,99 \pm 0,10$  en el caso del tratamiento con 50 mg/kg de NP (Fig. 1C).



**Figura 1: BPA y NP inducen muerte celular en testículo de rata.**

A las 24 horas post-administración de una sola inyección de BPA o NP (50 mg/kg) se observa un incremento significativo de células en apoptosis en testículos de rata. (A) Diferentes concentraciones de BPA aumentan la población de células en SubG1 (células apoptóticas, que corresponde al grupo de células dentro del marcador representado como M1) en células testiculares de ratas de 21 días de edad inyectadas con BPA por 24 horas. (B) Cuantificación de la población de células en SubG1 con los distintos tratamientos. (C) Recuento de células apoptóticas mediante tinción de PAS-He a las 12 y 24 horas post-tratamiento con 50 mg/kg BPA y NP en ratas de 21 días de edad., \* $p < 0,05$  con respecto al vehículo (etanol)  $N=3$ , cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM.

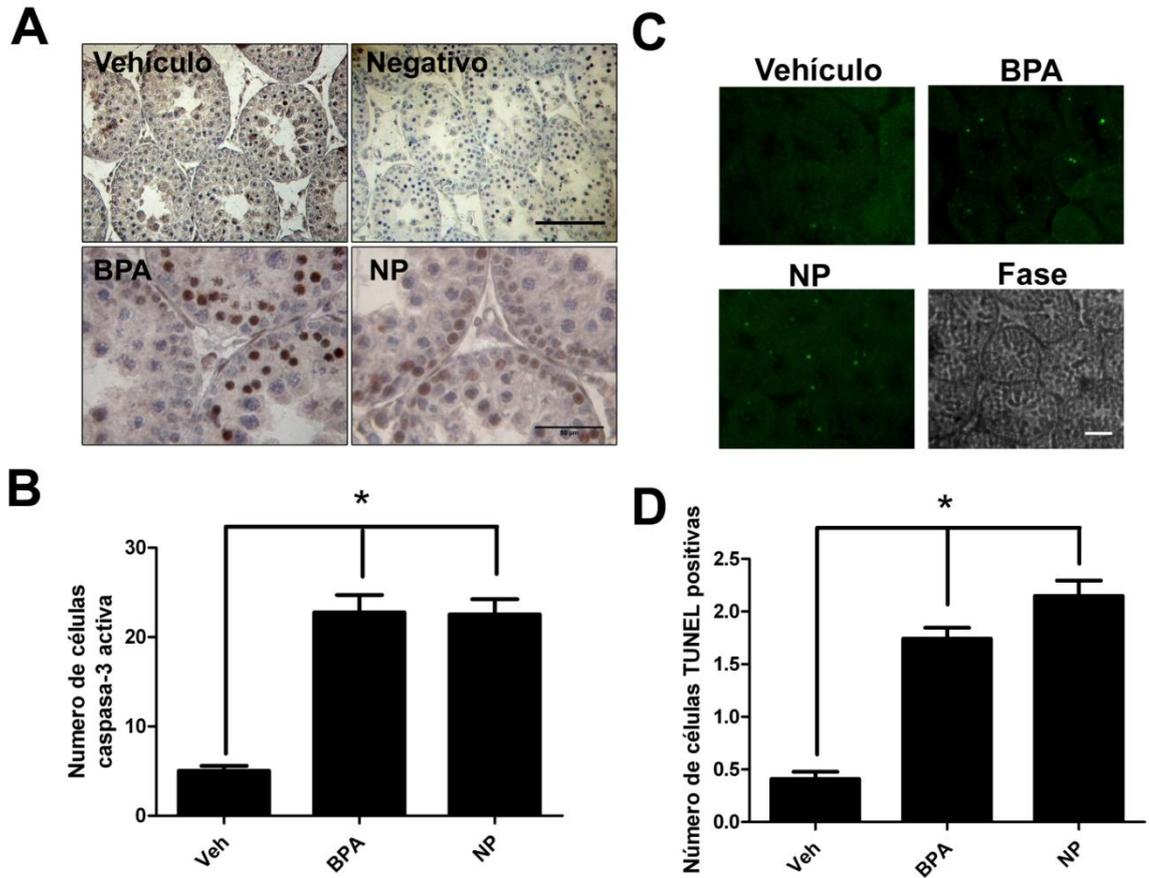
A continuación, confirmamos estos datos utilizando inmunotinción de caspasa-3 activa y análisis de TUNEL en los cortes de testículos de ratas de 21 días de edad 24 horas después de ser inyectadas con 50 mg/kg BPA o NP. La inmunotinción de la caspasa-3 activa aumentó desde un  $5,04 \pm 0,56$  células positivas por túbulo, en el caso del vehículo a un  $22,75 \pm 1,98$  para el BPA y un  $22,54 \pm 1,72$  en el caso del NP (Fig. 2A y B). Al igual que el resultado anterior, el número de células positivas para TUNEL aumentó de  $0,48 \pm 0,08$  células positivas para TUNEL por túbulo seminífero, a  $1,72 \pm 0,12$  y un  $2,19 \pm 0,18$ , con los tratamientos de 50 mg/kg BPA y NP, respectivamente (Fig. 2C y D). Es importante mencionar que, a pesar que la caspasa-3 es una proteína citoplasmática, la localización subcelular de la caspasa-3 activa es mayoritariamente nuclear. Este resultado concuerda con lo observado por otros autores en modelos de estudio *in vitro*, en los cuales se muestra que la caspasa-3 activa se localiza en el núcleo de células apoptóticas como resultado de una translocación desde el citoplasma (Kamada et al., 2005; Schindler et al., 2006). Es importante mencionar que luego del tratamiento con BPA, la inmunotinción de la caspasa-3 fue más intensa en espermatocitos (Fig. 2A). Por otro lado, la inmunorreacción de la caspasa-3 se detectó principalmente en espermatogonias y espermatocitos luego del tratamiento con NP. De esta manera, los resultados sugieren que los distintos tipos celulares responden diferencialmente a los tratamientos de BPA o NP.

La diferencia en el número de células apoptóticas detectadas por recuento de células picnóticas o por recuento de células positivas a TUNEL, se debe a que las células picnóticas (y por lo tanto su recuento), es sólo una aproximación a lo que se observa por TUNEL, tinción de caspasa-3 activa o cuantificación de población SubG1, que corresponde a técnicas más fiables, por lo que el recuento de células picnóticas debe ir siempre acompañado de, al menos, una de estas técnicas. Sin embargo, a pesar de la

diferencia en el número de células positivas para caspasa-3 activa o TUNEL, la relación de los tratamientos con BPA o NP respecto al vehículo es similar en ambos casos, demostrando la veracidad de la cuantificación.

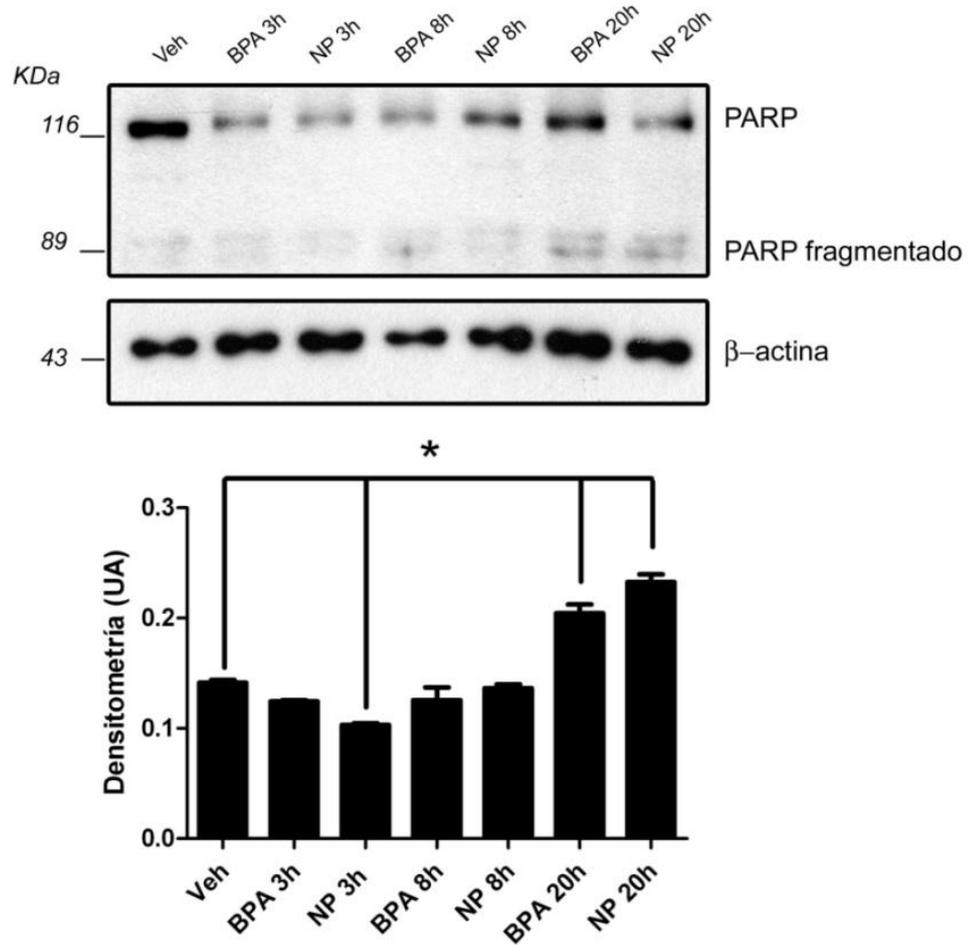
Para confirmar los resultados anteriores se determinó la formación del fragmento de PARP de 89 kDa, que es el producto de la proteína cortado por la caspasa-3, y su aparición es un indicio de muerte celular (Sola et al., 2007). Las ratas fueron inyectadas con 50 mg/kg BPA o NP, y luego de 3, 8 y 20 horas de tratamiento fueron sacrificadas para obtener las muestras. El fragmento de PARP de 89 kDa aumentó un 44,5% respecto al vehículo en el caso del tratamiento con BPA, y un 64,5% con NP luego de 20 horas de tratamiento (Fig. 3). Estos resultados, son consistentes con los de TUNEL y los de caspasa-3, indicando que un tratamiento agudo con dosis bajas de BPA o NP induce apoptosis en células germinales y que ésta se manifiesta alrededor de un día después (20 horas) de la administración de los xenoestrógenos.

Es interesante que se detectaron dos fragmentos de PARP cercanos a los 89 kDa (Fig. 3), ya que la fragmentación de PARP está mediada por la caspasa-3 y genera solo un fragmento C-terminal de 89 kDa (Soldani and Scovassi, 2002; Chaitanya et al., 2010), lo que sugiere que pueden existir otras proteasas implicadas en el corte de PARP luego del tratamiento con los xenoestrógenos (Chaitanya et al., 2010) o que PARP sufre modificaciones pos-traduccionales que cambian su peso molecular.



**Figura 2: El tratamiento con BPA o NP aumenta el número de células positivas para la caspasa-3 activa y TUNEL en testículos de rata.**

(A) Detección de la caspasa-3 activa por inmunohistoquímica en cortes de testículo de ratas de 21 días y 24 horas después de recibir una inyección intraperitoneal de 50 mg/kg BPA o NP. (B) Cuantificación del número de células caspasa-3 activa en (A). (C) Células positivas para TUNEL en cortes de testículo de rata de 21 días y 24 horas después de la inyección intraperitoneal de 50 mg/kg BPA o NP. (D) Cuantificación de células TUNEL positivas vistas en (C). Barra en control negativo y NP de (A) corresponde a 100 y 50  $\mu$ m, respectivamente. Barra en (C) corresponde a 50  $\mu$ m. \* $p < 0,05$  respecto al vehículo,  $N=3$ , cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM.

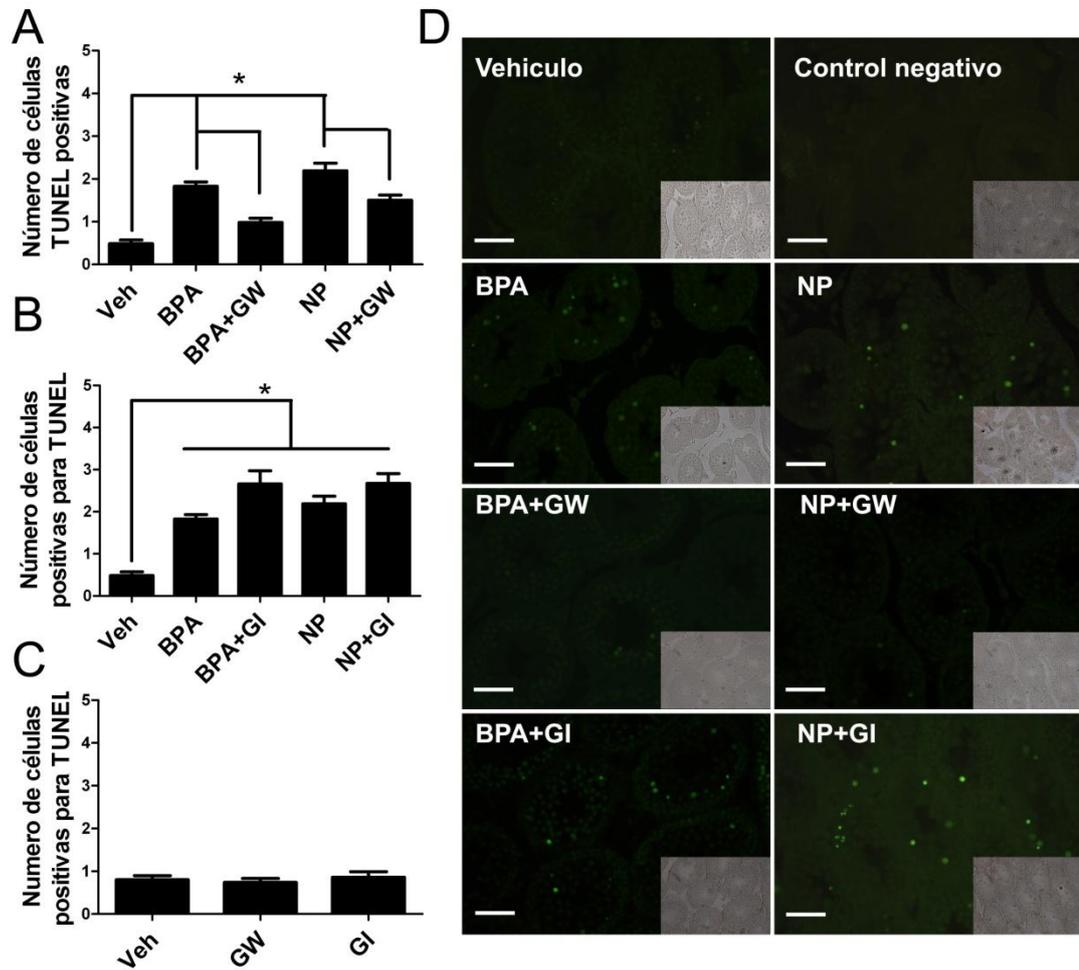


**Figura 3: Curso temporal del corte proteolítico de PARP en testículos de rata tratados con xenoestrógenos.**

El panel superior corresponde a un análisis de western blot del PARP fragmentado (89 kDa) presente en testículos de rata de 21 días de edad a los tiempos indicados que corresponden al tiempo post-tratamiento con 50 mg/kg BPA o NP. Panel central corresponde al control de carga mediante la detección de β-actina. Panel inferior, densitometría del fragmento de PARP de 89 kDa normalizado por el contenido de β-actina. \* $p < 0,05$  con respecto al vehículo (etanol),  $N=3$ , promedio  $\pm$  SEM.

### **6.1.1. ADAM17, pero no ADAM10, participa en la apoptosis inducida por xenoestrógenos**

Con los resultados anteriores comprobamos que los xenoestrógenos utilizados en este estudio inducen apoptosis en células germinales. Nuestro siguiente paso fue determinar si la ADAM17 participa en la muerte celular por apoptosis inducida por xenoestrógenos. Para ello inyectamos intratesticularmente el inhibidor de la ADAM17, GW280264X (GW), a una concentración de 10  $\mu$ M (Hundhausen et al., 2003; Lizama et al., 2011), para luego inyectar intraperitoneal BPA o NP a una concentración de 50 mg/kg. El tratamiento con GW previno significativamente el aumento del número de células germinales apoptóticas inducido por BPA o NP, registrándose  $0,98\pm 0,10$  y  $1,50\pm 0,12$ , células positivas para TUNEL, respectivamente (Fig. 4A y 4D). Estos datos representaron una disminución del 43,1% en el caso de BPA y 31,3% en el caso de NP. Debido a que los substratos de la ADAM17 también son procesados proteolíticamente por la ADAM10 (White, 2003; Edwards et al., 2008), es necesario determinar si la ADAM10 participa de la muerte celular observada en presencia de xenoestrógenos. Los resultados mostraron que 10  $\mu$ M del inhibidor de la ADAM10, GI254023X (GI) (Hundhausen et al., 2003; Lizama et al., 2011), no previno el aumento en la muerte celular por la apoptosis inducida por BPA o NP (Fig. 4B y 4D). La inyección de GW o GI por separado no afectó la muerte celular por apoptosis en comparación con el vehículo (Fig. 4C). Estos resultados sugieren fuertemente que la ADAM17, pero no la ADAM10, está involucrada en la muerte celular por apoptosis de células germinales de ratas púberes inducida *in vivo* por BPA y NP.



**Figura 4: Efecto de GI254023X y GW280264X sobre muerte celular por apoptosis inducida por xenoestrógenos en testículos de rata.**

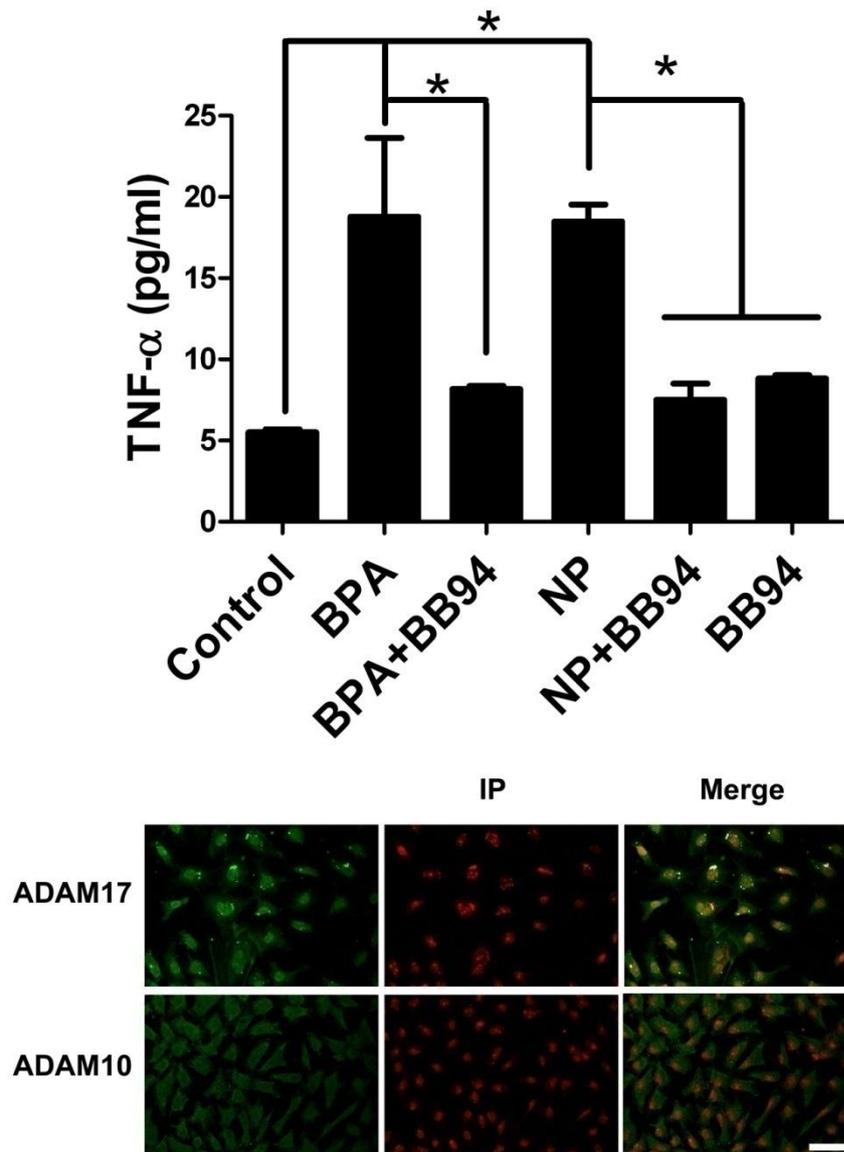
(A) Cuantificación de células positivas para TUNEL o índice apoptótico de testículos de ratas de 21 días de edad después de 24 horas de la administración de 50 mg/kg de BPA o NP. (B) La inyección de GW280264X reduce el número de células positivas para TUNEL. (C) El inhibidor de la ADAM10, GI254023X, no previno el aumento de células positivas para TUNEL en testículos de ratas. (D) Imágenes representativas de cada tratamiento. \* $p < 0,05$   $N=3$ , cada valor representa el promedio  $\pm$  SEM. Barras en D equivalen a 50  $\mu\text{m}$ .

Posteriormente quisimos evaluar si efectivamente BPA y NP inducen la activación de la ADAM17. Como se mencionó en la Introducción, esta enzima tiene múltiples substratos, y en ninguno de ellos se ha encontrado un sitio consenso de corte. Por lo tanto no existe un método *in vitro* o *in vivo* para medir directamente la actividad enzimática de la ADAM10 o la ADAM17. Es por esto que se debe recurrir a métodos alternativos para determinar la activación de esta enzima, algunos de los cuales son: el determinar su localización en la superficie de la célula, fosforilación del dominio citoplasmático o bien cuantificar el desprendimiento de proteínas blanco de la ADAM17 en cultivos celulares (Killock and Ivetic, 2010; Hall and Blobel, 2012). Por lo tanto, decidimos evaluar la activación de la ADAM17 por algunos de estos criterios. Se realizaron cultivos primarios de células de Sertoli debido a que estas células expresan TNF- $\alpha$ , que es un sustrato preferencialmente de la ADAM17. Estas células fueron tratadas con 10  $\mu$ M BPA o NP con el fin de determinar si en estas condiciones se detectaba liberación de TNF- $\alpha$  al medio de cultivo. La concentración de BPA y NP se eligió luego de ensayar otras más elevadas que indujeron la muerte de las células de Sertoli (Anexo Fig. 1). La liberación de TNF- $\alpha$  al medio de cultivo aumento luego de 24 horas de cultivo llegando a  $18,79 \pm 4,83$  pg/mL para BPA y  $18,50 \pm 1,02$  pg/mL en el caso de NP (Fig. 5A). Debemos aclarar en este punto que no pudimos utilizar el inhibidor específico de la ADAM17, GW280264X, en los estudios de liberación de TNF- $\alpha$  debido a que este compuesto reacciona con el *kit* de detección de la citoquina, produciendo falsos positivos (Anexo Fig. 2). En su reemplazo, usamos el inhibidor BB-94 a una concentración de 10  $\mu$ M, el cual es un inhibidor de general de metaloproteasas que no reacciona con el *kit* de detección que teníamos disponible. Este inhibidor disminuyó significativamente la liberación de TNF- $\alpha$  al medio, detectándose concentraciones de  $8,67 \pm 0,19$  pg/mL y 6,55 pg/mL con BPA y NP, respectivamente (Fig. 5A), lo que sugiere que la liberación de TNF-

$\alpha$  es dependiente de metaloproteasas. La incubación con 10  $\mu$ M de BB-94 no aumentó la liberación de TNF- $\alpha$ .

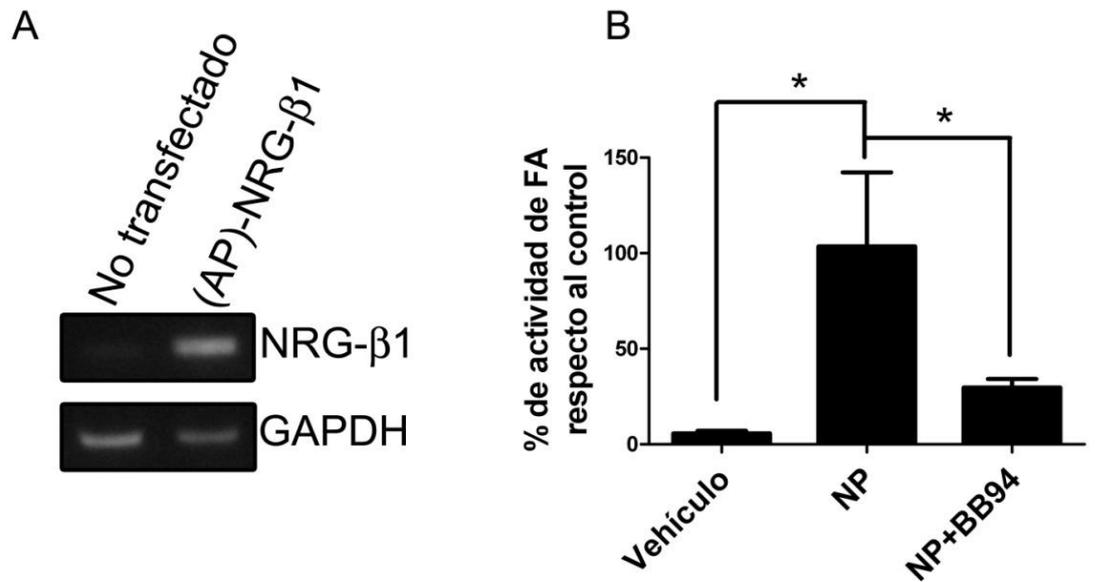
Para confirmar la presencia y localización de la ADAM17 en las células de Sertoli en cultivo, realizamos inmunofluorescencia en estas células. Se observó que la ADAM17 madura se localiza en pequeños gránulos y muy cerca de la zona nuclear, mientras que la ADAM10 se localiza de manera uniforme en todo el cuerpo celular (Fig. 5, panel inferior).

Como una aproximación alternativa para determinar la activación de la ADAM17, utilizamos cultivos primarios de células de Sertoli transfectadas transientemente con un plasmidio que contiene el sustrato específico de la ADAM17, neuregulina- $\beta$ 1 (White, 2003; Edwards et al., 2008), el cual está fusionado a una molécula reportera de fosfatasa alcalina (FA) ((AP)-NRG- $\beta$ 1, por sus siglas en inglés), el clivaje del sustrato de la ADAM17 permite la liberación de FA al medio de cultivo, donde puede ser cuantificada mediante un *kit* de detección. La aplicación de 10  $\mu$ M NP indujo un aumento de un 103,6% en la actividad de la ADAM17 (medido por la liberación de FA) respecto al control, mientras que la aplicación previa de 10  $\mu$ M BB-94 previno el aumento en la actividad de la ADAM17 (Fig. 6).



**Figura 5: Efecto de BPA y NP sobre liberación de TNF- $\alpha$  en células de Sertoli.**

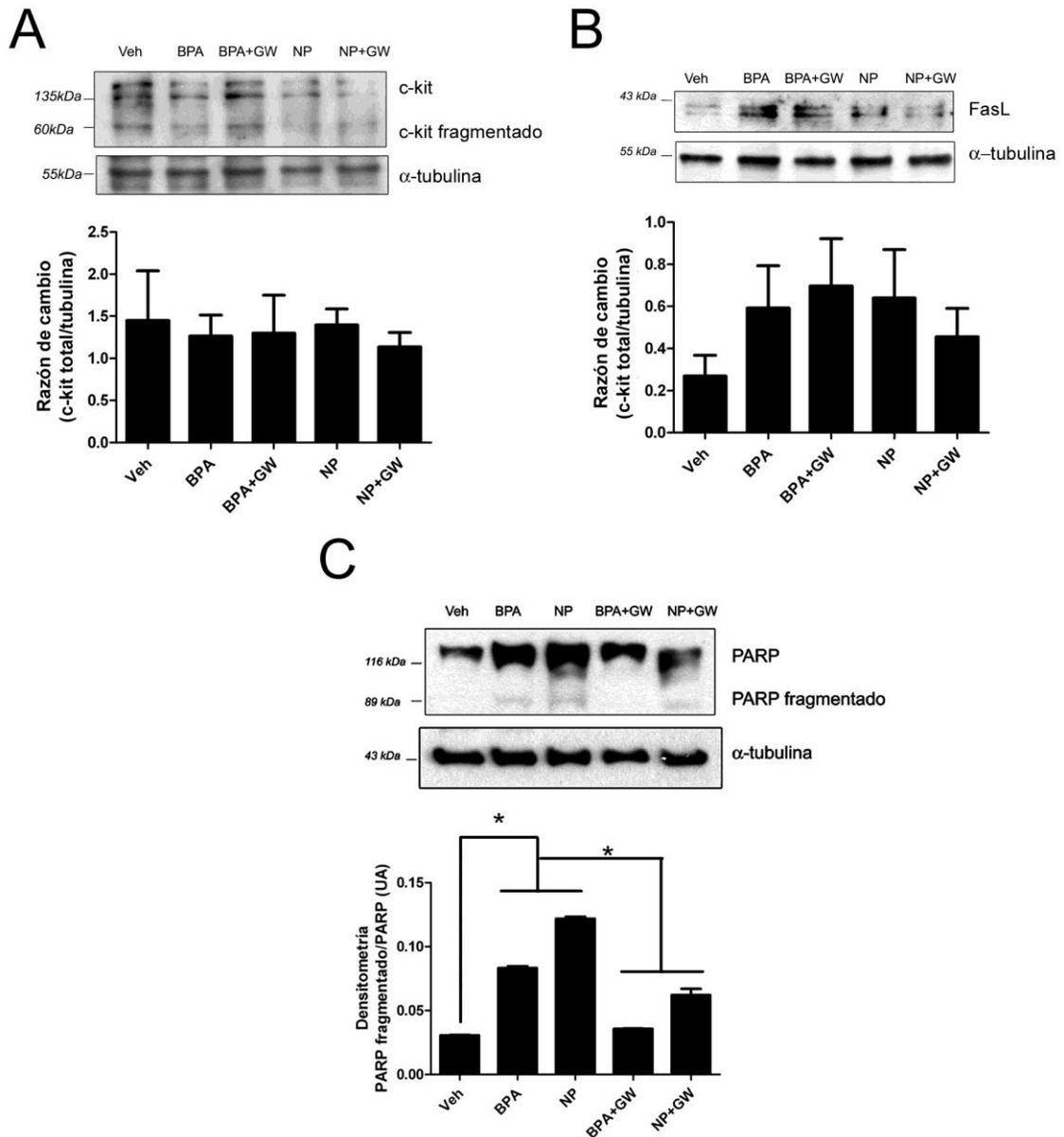
(A) Células de Sertoli expuestas a 10  $\mu$ M BPA o NP manifiestan un aumento en la liberación de TNF- $\alpha$  desde la superficie celular. La aplicación de 10  $\mu$ M BB-94, inhibidor de metaloproteasas, redujo significativamente el desprendimiento de TNF- $\alpha$ . (B) Localización de las ADAMs 17 y 10 fue detectada mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos en células de Sertoli en cultivo. Se observa que las células de Sertoli expresan ambas metaloproteasas; La ADAM17 presenta un patrón citoplasmático nuclear, mientras que la ADAM10 presenta un patrón preferentemente citoplasmático \* $p < 0,05$ , con un mínimo de 3 experimentos. Promedio  $\pm$  SEM. Barras en (B) equivalen a 50  $\mu$ m.



**Figura 6: NP induce un aumento en la actividad de la ADAM17 en cultivos primarios de células de Sertoli.**

(A) Células de Sertoli fueron extraídas desde testículos de ratas de 17 días de edad. Estas células fueron transfectadas transitoriamente con el plasmidio (AP)-NRG-β1. (B) El tratamiento con 10 μM NP aumentó significativamente la actividad de la ADAM17 respecto al control (eje X) y vehículo (etanol). La adición previa de 10 μM BB-94 previno el aumento de la actividad de la ADAM17 inducido por NP. \* $p < 0,05$ . Resultados obtenidos con un mínimo de 3 experimentos independientes. Promedio  $\pm$  SEM.

Con el fin de determinar qué mecanismo está involucrado en la inducción de la muerte celular dependiente de la ADAM17, se estudió la participación de diversas proteínas involucradas, directa o indirectamente, en la muerte de células germinales. El receptor c-kit es un importante componente de la maquinaria de sobrevivencia celular y sus niveles proteicos no cambian con los tratamientos de 50 mg/kg de BPA y NP o la adición del inhibidor de la ADAM17, GW280264X, en testículos de rata de 21 días (Fig. 7A). Algo similar ocurre con FasL, el ligando putativo de Fas, el cual está implicado en muerte celular inducida por DEHP (Yao et al., 2007) y que se encuentra aumentado en células TM4, que son de una líneas celular derivada de células de Sertoli de ratón, en respuesta a E2 (Catalano et al., 2007). En nuestros experimentos, los niveles de FasL aumentaron luego del tratamiento con 50 mg/kg de BPA y NP (Fig. 7B), pero este aumento resultó no ser estadísticamente significativo. Sin embargo, este aumento puede ser biológicamente relevante en los niveles de FasL y explicar, en parte, la muerte celular inducida por los xenoestrógenos. Estos resultados concuerdan con los expuestos en la literatura utilizando el metabolito activo del DEHP, MEHP, el cual afecta mayormente a las células de Sertoli (Lee et al., 1999; Yao et al., 2007) provocando un aumento en los niveles proteicos de FasL en estas células luego de la aplicación de MEHP, mientras que los niveles de Fas (Anexo Fig. 3), receptor de FasL, permanecen constantes en un principio pero se modifican posteriormente (Lee et al., 1999), sugiriendo que BPA y NP podrían actuar directamente sobre las células de Sertoli mediante el sistema Fas-FasL.



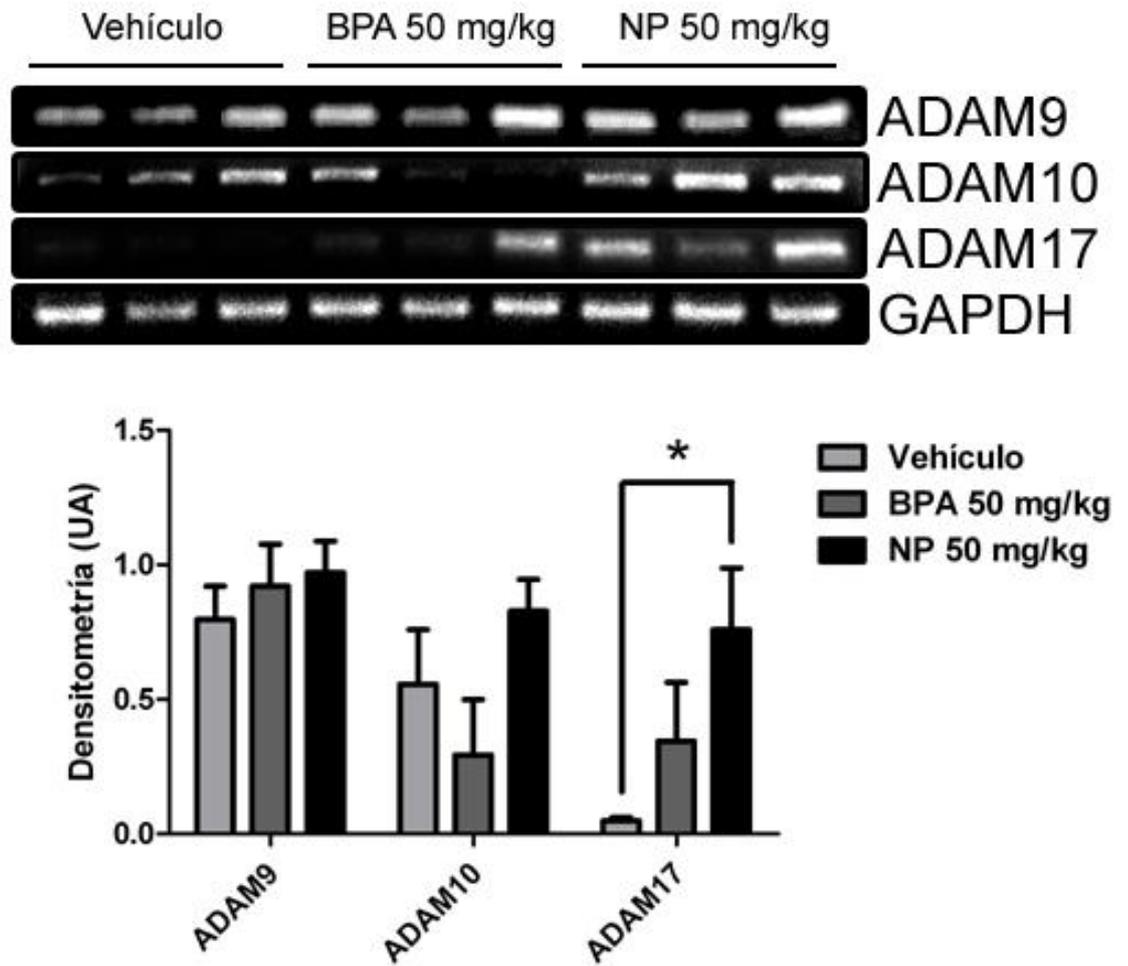
**Figura 7: BPA y NP inducen muerte de células germinales de una forma independiente de Fas y FasL.** (A) El panel superior muestra un western blot de c-kit en testículos de rata tratadas con 50 mg/kg BPA o NP de forma intraperitoneal. La aplicación de GW280264X directamente en el testículo no alteró los niveles proteicos de c-kit (ver panel inferior). (B) El panel superior muestra los niveles de FasL luego del tratamiento con 50 mg/kg de BPA y NP, la aplicación de GW280264X no modificó significativamente los niveles de FasL. Sin embargo, se observa un aumento con el tratamiento de BPA y NP, y una disminución de FasL cuando GW280264X fue inyectado previamente al NP. (C) Western blot de PARP en testículos de rata tratados de igual manera que en (A) y (B). La fragmentación de PARP (89 kDa) indica muerte. La fragmentación de PARP disminuye al aplicar GW280264X. \* $p < 0,05$ ,  $N=3$ , los valores corresponde al promedio  $\pm$  SEM.

Como se dijo anteriormente, PARP es una proteína involucrada en la reparación del DNA frente a un daño externo y su fragmentación es indicio de activación de las caspasas, ya que PARP es un sustrato conocido de caspasa-3 (Sola et al., 2007), por lo tanto es un marcador de muerte celular. PARP sufre una fragmentación luego del tratamiento con 50 mg/kg BPA o NP (Fig. 7C), mientras que este corte es prevenido con la aplicación de GW280264X previo al tratamiento con BPA o con NP (Fig. 7C, panel inferior), registrándose una disminución de un 57% y un 49% del corte de PARP, respectivamente. Este dato refuerza la idea que el tratamiento con GW280264X previene la muerte celular por apoptosis inducida por BPA y NP. Estos resultados sugieren que BPA y NP inducen muerte celular por apoptosis mediante un mecanismo que involucra a la ADAM17, y que la vía extrínseca de apoptosis podría estar involucrada en este proceso debido al aumento de FasL. Esto lo comprobamos mediante la inyección de un inhibidor de caspasa-9, un miembro de la familia de las caspasas, proteasas encargadas de llevar a cabo la apoptosis, específicamente la apoptosis intrínseca, la que al ser inhibida no debe afectar la muerte inducida por xenoestrógenos en nuestro modelo. Mediante el conteo de células positivas para caspasa-3, de la misma forma que la Fig. 2, observamos que, efectivamente, el inhibidor de caspasa-9 no afecta la muerte celular por apoptosis inducida por BPA y NP, y de hecho, la aumenta significativamente en presencia de este último xenoestrógeno (Anexo Fig. 4).

Los resultados de esta sección sugieren que los xenoestrógenos producen activación de la ADAM17 y esta proteína participa activamente en la muerte celular por apoptosis, posiblemente por la vía extrínseca, de células germinales inducida por BPA y NP.

## ***6.2. Evaluar si los xenoestrógenos BPA y NP alteran los niveles y localización de las ADAM9, ADAM10 y ADAM17 en el testículo de ratas de 21 días***

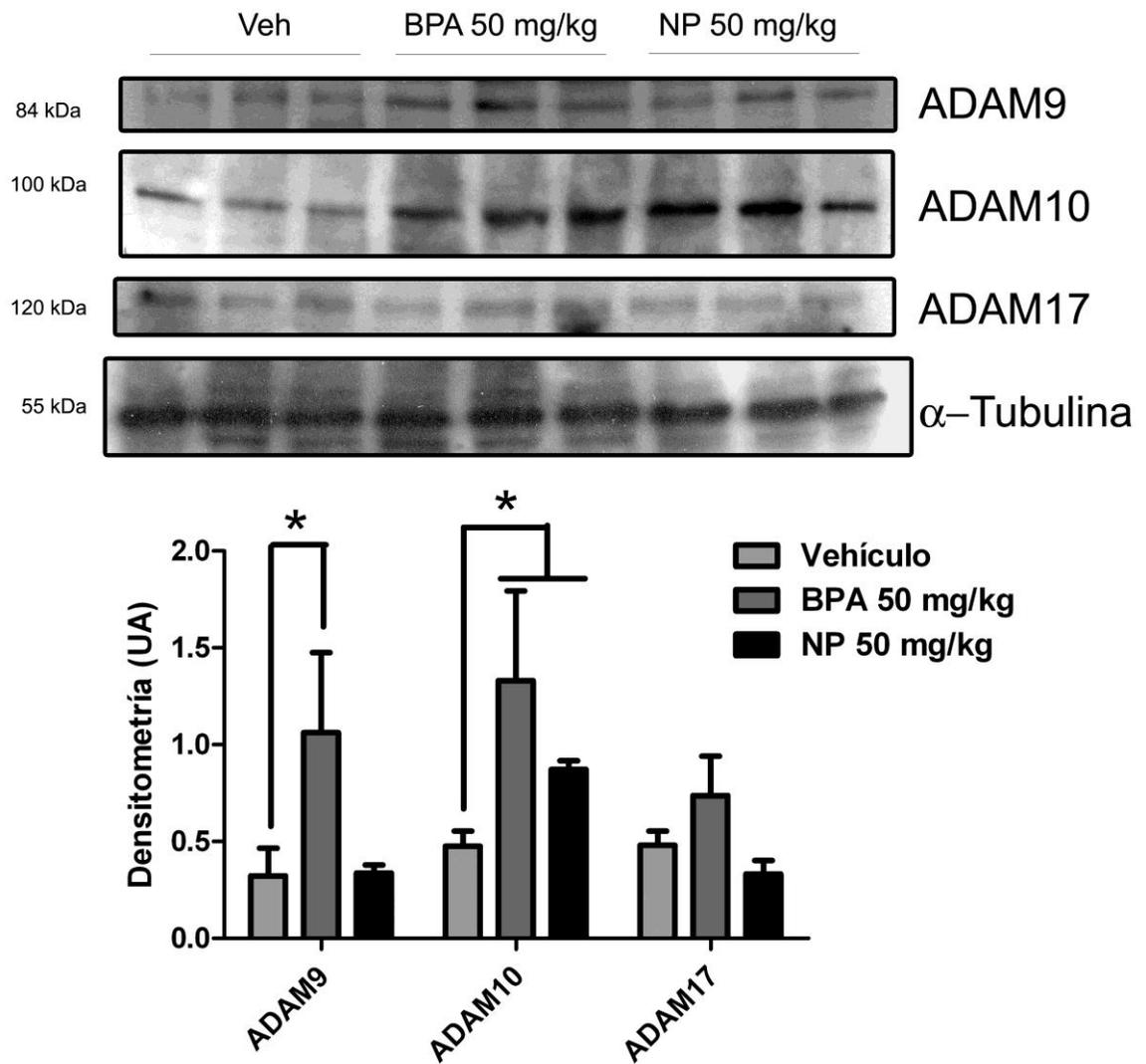
Dado que el inhibidor de la ADAM17 GW280264X previene la apoptosis de células germinales inducida por el tratamiento de NP o BPA, se estudió si los niveles de mRNA de tres miembros de la familia ADAM: ADAM9, 10 y 17 cambian en los testículos de ratas tratadas con estos xenoestrógenos. El mRNA de la ADAM17 aumentó más de 15 veces en ratas de 21 días tratadas con 50 mg/kg de NP, respecto de aquellas tratadas sólo con vehículo (Fig. 8A y 8B), sin encontrarse cambios significativos en los niveles de los mensajeros de las ADAM10 o ADAM9 (Fig. 8B). El tratamiento de 50 mg/kg BPA aumentó 7 veces los niveles del mRNA de la ADAM17 respecto al vehículo, y disminuyó los niveles del mRNA de la ADAM10, pero en ninguno de estos casos las diferencias resultaron ser estadísticamente significativas. Este último resultado es interesante debido a que los niveles proteicos de las ADAM10 y ADAM9 aumentaron significativamente luego del tratamiento con 50 mg/kg BPA o NP (Fig. 9A). Algo similar se observó en el caso de la ADAM9 en que los niveles del mRNA no cambiaron, pero sí aumentaron los de la proteínas en aquellas ratas tratadas con 50 mg/kg de BPA (Figs. 8 y 9).



**Figura 8: El tratamiento con BPA o NP aumenta los niveles de mRNA de la ADAM17 pero no afecta los niveles de mRNA de las ADAMs9 y 10.**

(A) Los niveles de mRNA por RT-PCR de testículos de rata de 21 días después de 24 horas de ser tratados con 50 mg/kg BPA o NP. (B) Cuantificación por densitometría de (A). Sólo se observa un aumento significativo de los mRNA de la ADAM17 en presencia de NP. \*  $p < 0,05$  respecto al vehículo (etanol).  $N=3$ , cada valor representa el promedio  $\pm$  SEM.

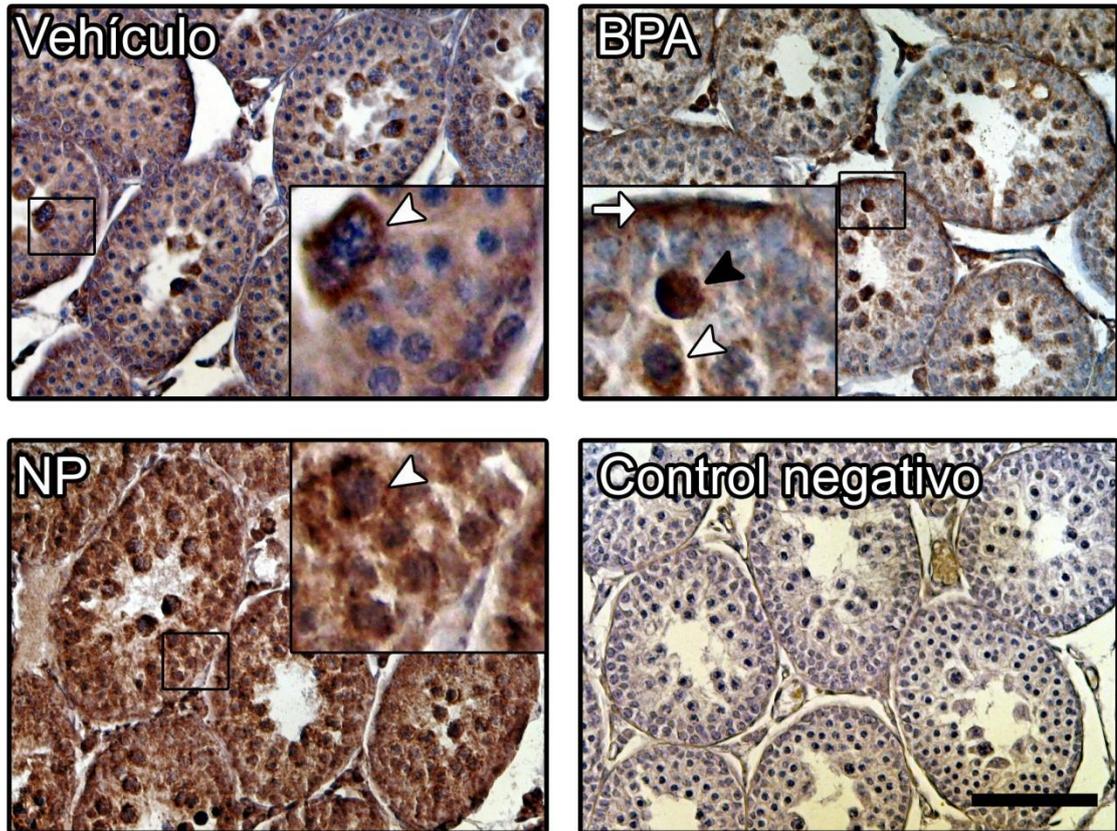
La disminución del mRNA de la ADAM10 podría explicar el aumento de la proteína visto después de la aplicación de BPA debido a una traducción del mRNA y la consiguiente degradación de dicho mRNA. Sin embargo, la inyección de 50 mg/kg de NP no disminuyó los niveles del mRNA de la ADAM10 (Fig. 8), pero sí un aumento en los niveles proteicos de ésta (Fig. 9A), sugiriendo que el BPA y el NP actúan por vías distintas en cuanto al aumento de los niveles proteicos de la ADAM10; la aplicación del BPA podría aumentar los niveles de la ADAM10 activando la vía de traducción desde el mRNA, disminuyendo los niveles de éste, mientras que el NP podría activar la transcripción de la ADAM10, aumentando no sólo los niveles de proteína, sino también los niveles de mensajero de esta enzima. Es interesante observar que no hubo ningún cambio estadísticamente significativo en los niveles proteicos de la ADAM17, en ninguno de los tratamientos (Fig. 9A y 9B). Este último dato sugiere que los xenoestrógenos podrían incrementar la actividad de la ADAM17 y no sus niveles proteicos. Para evaluar esta posibilidad, realizamos análisis de western blot de los niveles de la ADAM17 madura utilizando un anticuerpo que reconoce el sitio de activación de esta metaloproteasa. La cuantificación de tres experimentos independientes utilizando extractos de testículos totales de ratas tratadas con vehículo o 50 mg/kg de BPA o NP, demostró que la ADAM17 madura no aumenta (Anexo Fig. 5), sugiriendo que BPA y NP podrían inducir una activación de la ADAM17.



**Figura 9: BPA y NP afectan diferencialmente los niveles proteicos de tres miembros de la familia ADAM.**

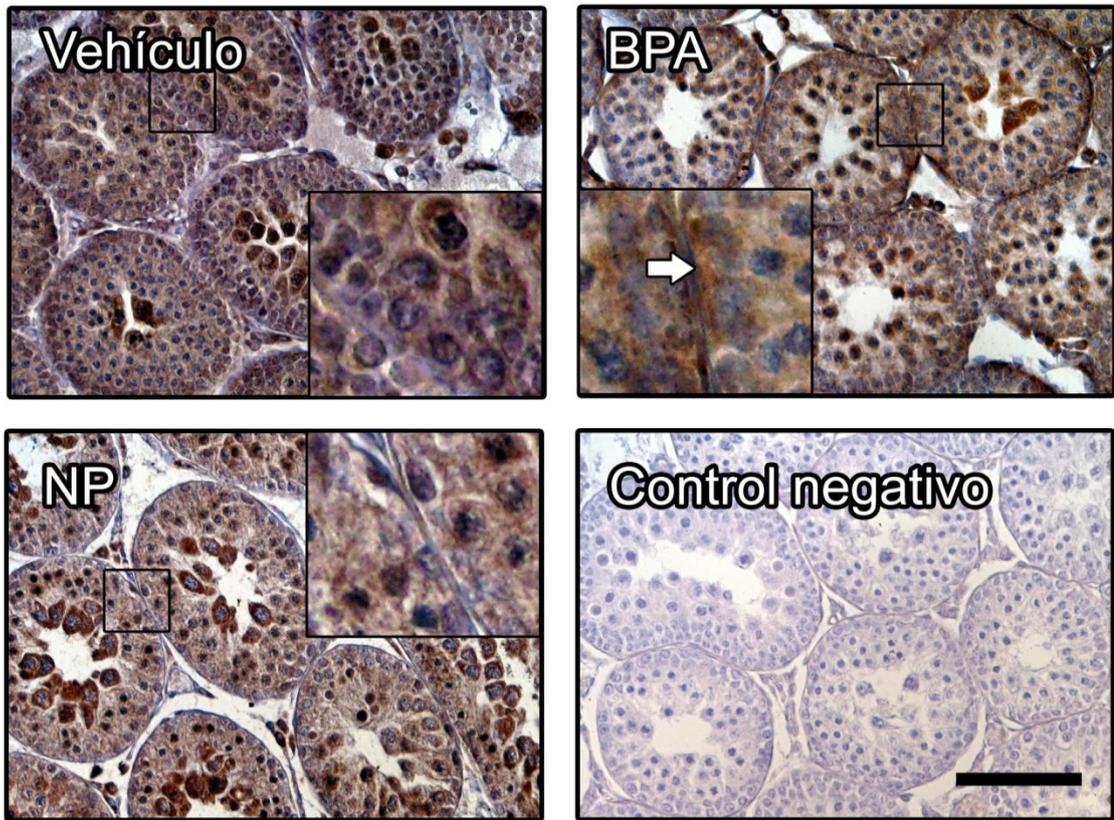
(A) Niveles de proteínas de las ADAMs17, 10 y 9 mediante análisis de western blot en homogenados de testículos de rata de 21 días después de 24 horas de tratamiento con 50 mg/kg de BPA y NP. Cada carril representa un animal distinto, es decir, 3 experimentos independientes. (B) Cuantificación por densitometría de (A). \* $p < 0,05$  con respecto al vehículo (etanol). N=3, Promedio  $\pm$  SEM.

Nuestro próximo paso fue determinar la localización celular de los distintos miembros de la familia de las ADAMs utilizando inmunohistoquímica en cortes de testículos de rata de 21 días después de 24 horas de tratamiento con vehículo o con 50 mg/kg de BPA y NP. La ADAM10 presenta una localización ubicua pero preferencialmente se encuentra en espermatoцитos (células grandes y circulares más cercanas al lumen tubular) tanto en vehículo como con el tratamiento de BPA (Fig. 10, inset). Posteriormente, inmunolocalizamos la ADAM17 utilizando un anticuerpo que reconoce sólo la forma madura, es decir, la forma activa de esta, en los cortes de testículo tratados con NP. Observamos que todas las células presentan tinción positiva pero las células con una mayor inmunorreacción fueron los espermatoцитos (Fig. 11). Cuando las ratas recibieron el tratamiento de BPA, la tinción disminuyó en los espermatoцитos pero aumentó en la base de los túbulos (Fig. 11, BPA). En el caso de las ratas tratadas con NP, una gran cantidad de espermatoцитos presentaron tinción positiva para la ADAM17, aunque con un patrón muy similar al inducido por el vehículo (Fig. 11). Esto concuerda con los análisis de Western blot de la ADAM17, sugiriendo que los xenoestrógenos aumentan la actividad de ADAM17, y no los niveles proteicos de esta enzima.



**Figura 10: Localización de la ADAM10 en testículo de rata de 21 días después de 24 horas de la administración de BPA y NP.**

Ratas de 21 días de edad fueron inyectadas con 50 mg/kg de BPA y NP, o con vehículo (etanol), y sacrificadas luego de 24 horas. Utilizando un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la ADAM10, la mayor cantidad de células con tinción positiva fueron identificadas como espermatocitos (cabeza de flecha blanca, Veh y 50 mg/kg BPA) y el tratamiento de BPA aumentó la localización basal de la ADAM10 (flecha blanca en BPA). Cabeza de flecha negra muestra una célula apoptótica positiva para la ADAM10 en el tratamiento con BPA. Barra: 100  $\mu$ m.



**Figura 11: Localización de la ADAM17 en testículos de ratas de 21 días después de la administración de BPA y NP por 24 horas.**

Ratas de 21 días de edad fueron tratadas con xenoestrógenos (50 mg/kg de BPA y NP) o con vehículo (5  $\mu$ M etanol). El vehículo distribuyó la marca preferente en espermatozoides. Sin embargo, se detectó inmunoreactividad en todas las células tubulares (inset en vehículo). El BPA aumentó la inmunotinción de la ADAM17 madura en células más cercanas a la base de los túbulos (flecha blanca en inset de BPA), mientras que NP no afectó la localización de la ADAM17 respecto al vehículo. Barra: 100  $\mu$ m.

### **6.2.1 BPA y NP inducen la localización de la ADAM17 en la superficie de las células germinales.**

Como se mencionó anteriormente, diversos estudios indican que sólo la forma activa y procesada (sin el prodominio) de la ADAM17 se localiza en la superficie de la células, por lo que la presencia de esta enzima en la superficie celular externa podría ser utilizada como un indicador de su actividad (Peiretti et al., 2003; Killock and Ivetic, 2010). Para probar si esto ocurre en células tratadas con BPA o NP, decidimos realizar biotilación de las proteínas de la superficie celular de cultivos primarios de células de Sertoli. Para esto, las células de Sertoli de rata fueron tratadas con vehículo o 10  $\mu$ M BPA o NP por 3 horas, para luego realizar la bionitilación de proteínas de superficie. Para determinar los niveles de la ADAM17 utilizamos un anticuerpo que reconoce sólo la forma madura de ésta y que se une al sitio de corte del prodominio de la ADAM17. La forma madura (que en estas células es de 60 kDa, se detectó tanto en la fracción de membrana como en la fracción total (Fig. 12B). En cambio, la proenzima (120 kDa) se encontró solo en la fracción total de células, mostrando que en la superficie celular sólo se encuentra ADAM17 madura de 60 kDa (Fig. 12B). La banda de 60 kDa corresponde al producto de la proteólisis de la forma activa de 80 kDa descrita por Blobel y cols. (Schlondorff et al., 2000) y que es llevada a cabo por metaloproteasas intracelulares, que no son inhibidas por BB-94. Otros anticuerpos dirigidos contra la cola citoplasmática de la ADAM17 no reconocen esta forma (Schlondorff et al., 2000), pero debido a que el anticuerpo utilizado en este caso reconoce la ADAM17 por su extremo N-terminal (extracelular), permite localizar la forma de 60 kDa. Además, el tratamiento con NP indujo un aumento de aproximadamente un 30% de la forma de 60 kDa de la ADAM17 en la fracción total, mientras que en el caso del BPA, se elucidó una disminución de aproximadamente un 26%

en la banda de 60 kDa de ADAM17 en células de Sertoli de rata en cultivo primario (Fig. 12).

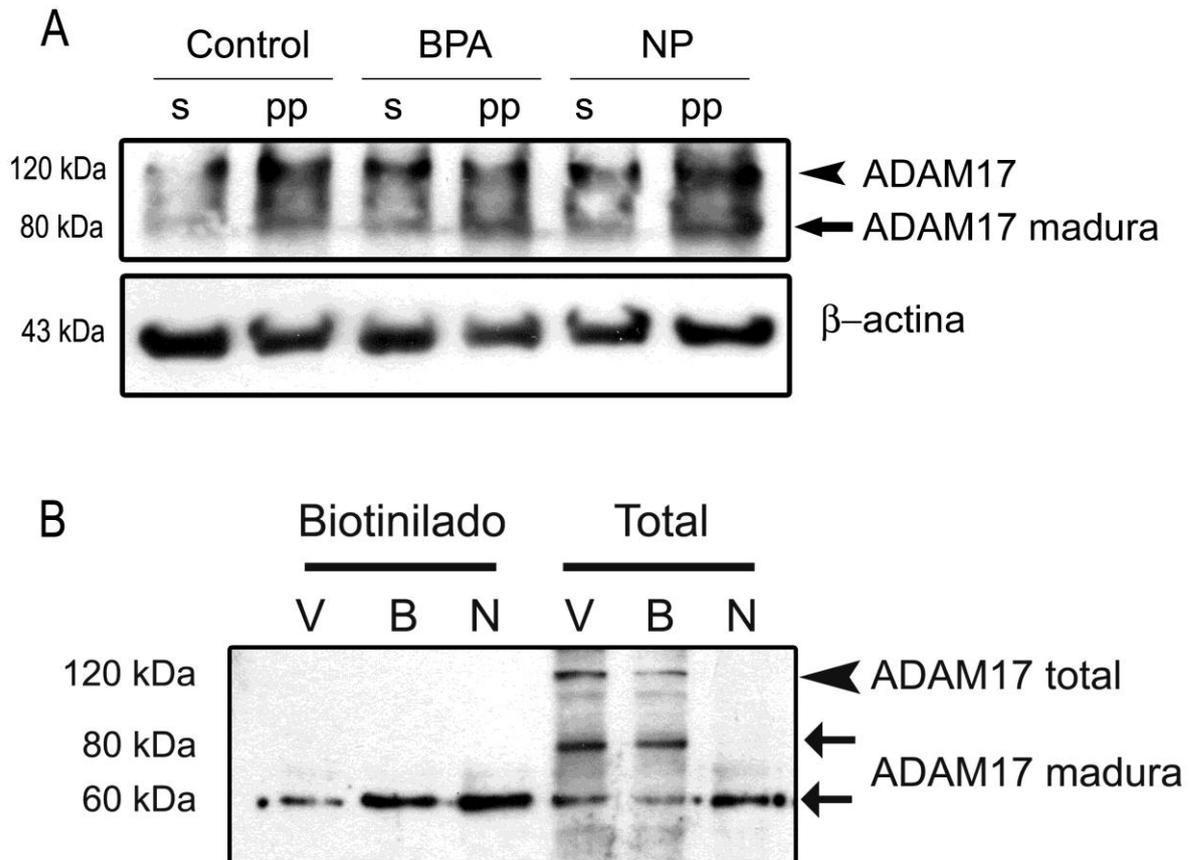
Debido a que encontramos que BPA y NP inducen un aumento en los niveles de ADAM17 madura (60 kDa) en la superficie, en cultivos primarios de células de Sertoli, decidimos estudiar si esto ocurre en células totales aisladas desde túbulos seminíferos. Para esto, las ratas fueron tratadas con vehículo o con 50 mg/kg BPA o NP por 24 horas, se aisló las células de los túbulos seminíferos y se realizó una inmunoprecipitación de aquellas células positivas para la ADAM17 en la superficie celular. Las células aisladas y vivas fueron incubadas a 4°C por 4 horas con un anticuerpo contra la ADAM17 que reconoce su extremo N-terminal, el mismo que utilizamos previamente en el estudio de biotinylation. Las células positivas para la ADAM17 fueron inmunoprecipitadas y sonicadas y posteriormente se realizó un análisis de Western blot de ADAM17 en el extracto proteico de aquellas células inmunoprecipitadas (pp) y de aquellas que permanecieron en el sobre nadante (s, Fig. 12A).

Tal como esperábamos, la ADAM17 madura se encontró mayormente en la fracción pp (Fig. 12A), apoyando la hipótesis que la ADAM17 está activa en la superficie. También se detectó la enzima madura en la fracción pp y en la fracción s, mostrando que las células que poseen esta enzima en la superficie, como aquellas que no, tienen la ADAM17 madura. Existen al menos dos explicaciones plausibles para este hallazgo: 1) la activación de la ADAM17 ocurre en el *trans*-golgi, debido a que en este sitio es donde se encuentra la enzima furina, que activa a la ADAM17 (Molloy et al., 1994; Peiretti et al., 2003), por lo que es posible que los niveles detectados en las células negativas para la ADAM17 sean aquellas moléculas procesadas pero aún no expuestas en la superficie, ó 2)

la actividad de la ADAM17 puede ocurrir en vesículas provenientes desde la membrana plasmática en las que se internaliza tanto la enzima como el sustrato (Lee et al., 2013), para que este último sea excretado posteriormente, por lo que es posible detectar la ADAM17 madura en células negativas para esta metaloproteasa en superficie.

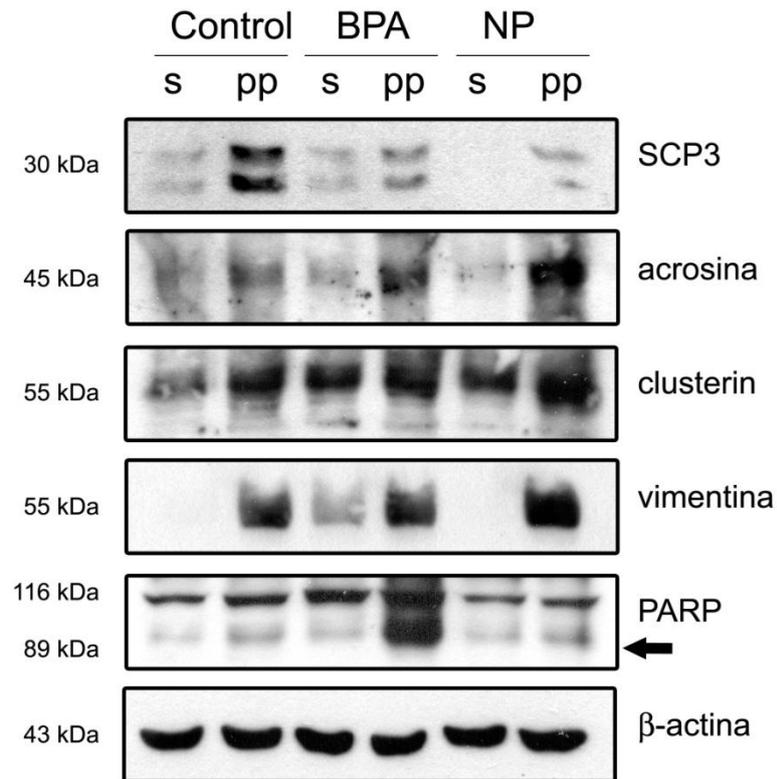
Posteriormente, quisimos caracterizar las células positivas para la ADAM17 (fracción pp) usando marcadores para distintos tipos celulares (Fig. 13). Las células de la fracción pp mostraron fuertes bandas de vimentina (marcador de Sertoli), SCP-3 y acrosina (marcadores de células germinales), lo que demuestra que la ADAM17 madura se encuentra en estos dos tipos celulares, y refuerza los resultados usando inmunohistoquímica. El tratamiento con NP aumentó los niveles de SCP-3, acrosina, clusterin y vimentina en las células positivas para la ADAM17, mientras que el tratamiento con BPA aumentó los niveles de vimentina y clusterin en células negativas para la ADAM17 (fracción pp) mostrando, nuevamente, que estos dos compuestos tienen efectos distintos en el testículo de rata. Junto con lo anterior, se observó que la fragmentación de PARP, marcador de muerte celular, se encuentra aumentada en aquellas células tratadas con los xenoestrógenos y positivas para la ADAM17, pero este aumento es más notorio en el de BPA (Fig. 13).

Estos resultados sugieren que los xenoestrógenos aumentan los niveles de la ADAM17 madura en la superficie de los distintos tipos celulares dentro de los túbulos seminíferos (células de Sertoli y germinales), favoreciendo la muerte por apoptosis de células germinales.



**Figura 12: Niveles en la superficie celular de la ADAM17 madura en células de Sertoli.**

(A) Precipitación de células positivas para la ADAM17 en control (vehículo; etanol), tratadas con 50 mg/kg BPA o NP por 24 horas. La cabeza de flecha indica la banda esperada de 120 kDa para la ADAM17 total, observándose un aumento de la ADAM17 en el control y luego del tratamiento con NP. Mientras que el tratamiento con BPA indujo que tanto las células ADAM17 negativas (s) y positivas (pp) tengan la misma cantidad de la ADAM17 madura. La flecha indica una banda de aproximadamente 80 kDa, la cual corresponde a la ADAM17 madura. (B) Utilizando biotinylación de proteínas de membranas, detectamos que tanto BPA como NP aumentaron la forma activa de la ADAM17 de 60 kDa (flecha inferior) en la fracción biotinilada, mientras que la forma activa de 80 kDa desaparece (flecha superior) en esta fracción. En la fracción total se detectaron tres bandas: una de 120 kDa que corresponde a la ADAM17 en su forma de pro enzima, la fracción de 80 kDa y la fracción de 60 kDa. Esta última se encontró aumentada luego del tratamiento con NP, a la vez que desaparecieron las bandas de 120 y 80 kDa.



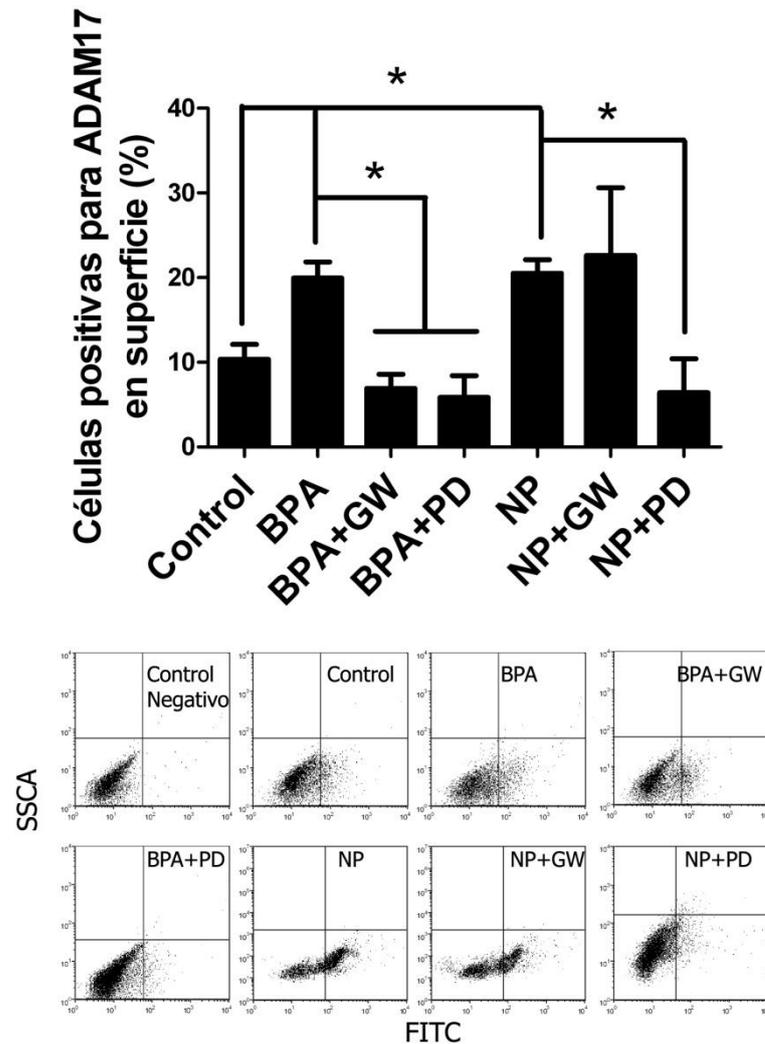
**Figura 13: Células positivas para la ADAM17 expresan marcadores de células germinales y de Sertoli.** Células aisladas desde testículos de ratas de 21 días después de 24 horas de haber sido tratadas con 50 mg/kg BPA, NP o vehículo (control) fueron sometidas a inmunoprecipitación para aislar células que expresan la ADAM17 en la superficie celular. Se realizaron análisis de Western blot de SCP3, acrosina, clusterin, vimentina y PARP en los extractos de células que expresan y que no expresan la ADAM17 en la superficie celular. Se observa presencia de marcadores de células germinales (SCP-3 y acrosina) como de células de Sertoli (clusterin y vimentina). PARP es un marcador de muerte celular y se encuentra aumentado en células ADAM17 positivas.

Hasta ahora sabemos que sólo la ADAM17 madura se encuentra en la superficie celular, pero no sabemos si esto corresponde a un aumento en el número de células positivas para la ADAM17 madura o si hay un cambio en la cantidad de la ADAM17 por célula. Para contestar estas preguntas se estudió por medio de citometría de flujo en células vivas aisladas de túbulos seminíferos de ratas de 21 días de edad tratadas con 50 mg/kg BPA o NP por 24 horas. Los resultados mostraron que efectivamente BPA y NP inducen un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de células que portan la ADAM17 en su superficie (Fig. 14), desde un  $10,36 \pm 1,8\%$  (control) a un  $19,9 \pm 1,9\%$  en el caso del BPA y a un  $20,5 \pm 1,60\%$  en el caso de NP, representando así, un aumento de un 92,4% y de un 98,1%, respectivamente. Esto sugiere que ambos xenoestrógenos podrían actuar en el sistema de translocación de esta metaloproteasa o inhibiendo su degradación. En testículos previamente inyectados con GW280264X, un inhibidor de la ADAM17, la inyección de BPA redujo a un  $6,93 \pm 1,66\%$  el porcentaje de células positivas para la ADAM17, lo que representó un valor similar al control y una disminución de un 65,24% en relación al tratamiento solo con BPA (Fig. 14). En el caso del tratamiento con NP junto con el inhibidor de la ADAM17 (GW), el porcentaje de células positivas para la ADAM17 fue de  $22,6 \pm 8,0\%$ , lo que no representó un cambio en relación al tratamiento solo con NP (Fig. 14). Este último resultado concuerda con la fosforilación de la ADAM17, que es otro evento que demuestra la activación de las proteínas ADAMs, después del tratamiento con NP en presencia o ausencia de GW (Anexo Fig. 6), mostrando que el inhibidor de la ADAM17 no afecta la fosforilación de ésta. Estos resultados sugieren nuevamente, que BPA y NP activan diferentes vías y que sólo BPA estimula un mecanismo auto regulatorio sobre la ADAM17, que puede ser revertido por inhibidores de la esta misma metaloproteasa. En el caso de la ADAM10 no hay respuesta de los anticuerpos en las células vivas (Anexo Fig. 7), por lo que no pudieron ser analizadas. Sin embargo, con

nuestros primeros resultados, la ADAM10 fue descartada como un participante activo de la muerte por apoptosis de células germinales.

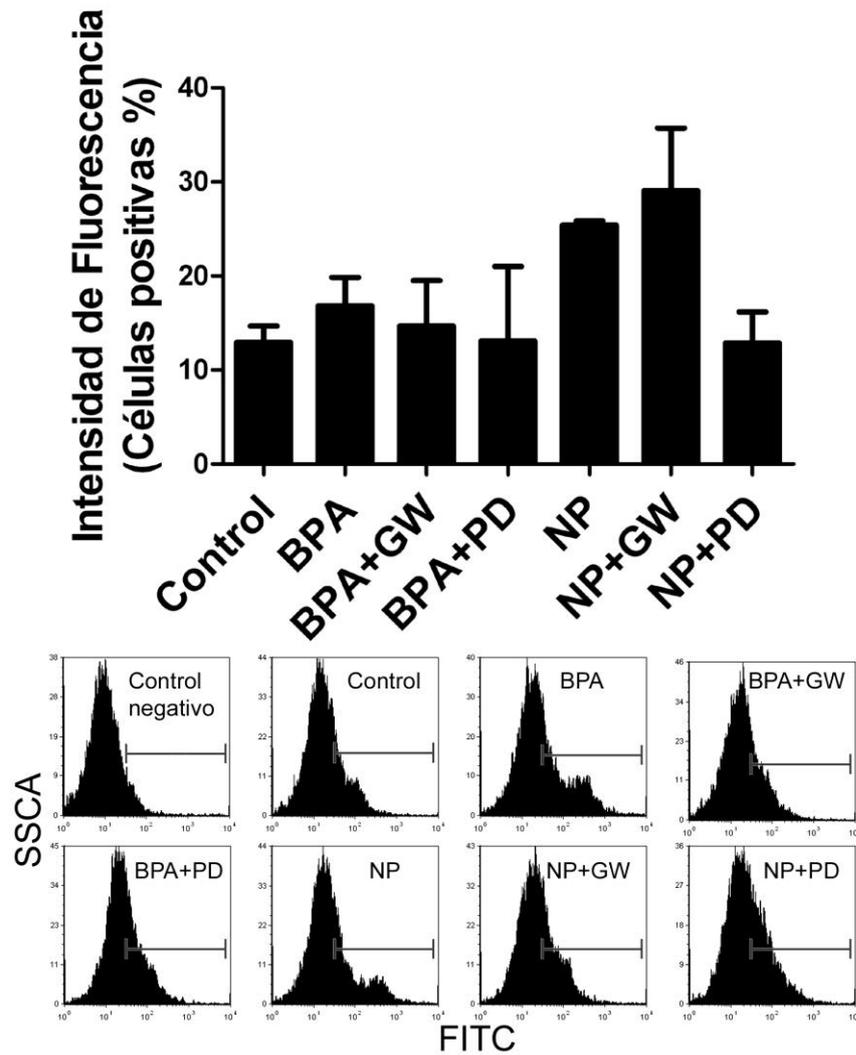
Si bien el porcentaje de células positivas para la ADAM17 aumenta después del tratamiento de BPA o NP, es necesario determinar si es que la intensidad de fluorescencia también cambia, ya que nos indica si realmente existen más moléculas de la ADAM17 por célula o si sólo aumenta el número de células portando la ADAM17 en la superficie (Fig. 15). En este sentido, la intensidad de fluorescencia para la ADAM17 presentó una tendencia a aumentar, sin ser significativa, después de los tratamientos con BPA y NP. La aplicación de GW no indujo cambios en la intensidad de fluorescencia. Al observar cambios en el número de células positivas para la ADAM17, pero no en la intensidad de fluorescencia de cada una, podemos decir que BPA y NP aumentan el número de células portadoras de la ADAM17 en la superficie, pero afectan el número de moléculas de la ADAM17 por cada célula, ya que la intensidad no se modificó.

En conclusión, los datos presentados en esta sección sugieren que NP y BPA activan la ADAM17 debido a que promueven un aumento de esta enzima en la superficie celular y que estos xenoestrógenos inducen liberación de sustratos, como TNF- $\alpha$  desde células de Sertoli en cultivo. Además, mostramos que tanto las células germinales, como las células de Sertoli, expresan la ADAM17 en la superficie.



**Figura 14: La localización de la ADAM17 en la superficie celular inducido por BPA o NP es modulado por ADAM17 y p38<sup>MAPK</sup>.**

En el panel superior se muestra el porcentaje de células ADAM17 positivas en la superficie 24 horas después de la administración de 50 mg/kg BPA o NP más 10 $\mu$ M GW280264X o 5 $\mu$ M de PD169316 por 24 horas. Se observa que BPA y NP inducen un aumento del porcentaje de células positivas para la ADAM17, el cual fue disminuido tanto con GW280264X como con PD169316 en el caso de BPA, y sólo con PD169316 en el caso de NP. Panel inferior, muestra representativa de gráficos *dot-plot* de las citometrías de flujo cuantificadas en panel superior. Se utilizó un mínimo de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ . Promedios  $\pm$  SEM.



**Figura 15: La intensidad de fluorescencia de la ADAM17 en la superficie de células testiculares aisladas no cambia no cambia luego de la aplicación de BPA o NP.**

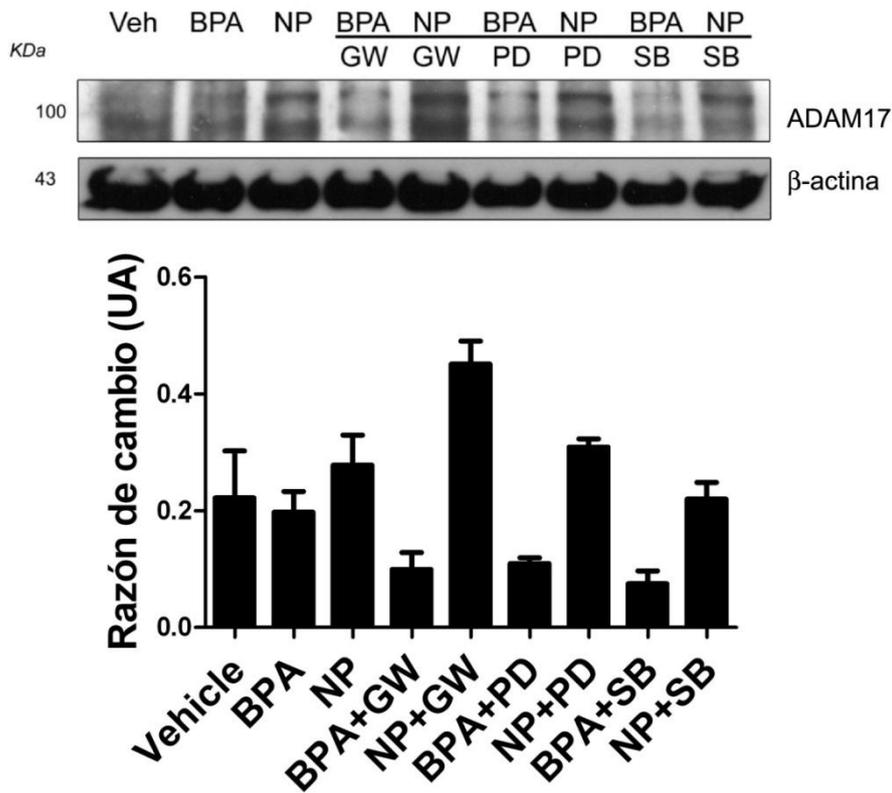
En el panel superior de la figura se muestra la intensidad de FITC de células ADAM17 positivas en la superficie luego de 24 horas post tratamiento de las ratas con BPA o NP (50 mg/kg) más GW280264X o PD169316. Se observa un cambio visualmente importante en células tratadas con BPA o NP pero que no resultó ser estadísticamente significativo, los cuales parecen ser idénticos al vehículo al ser tratados con GW280264X o PD169316. Se utilizó un mínimo de 3 experimentos independientes sin observarse diferencias significativas. Promedios $\pm$ SEM.

### ***6.3. Determinar si p38MAPK participa en la apoptosis dependiente de la ADAM17 inducida por BPA o NP.***

La información en la literatura avala el papel de la p38<sup>MAPK</sup> como un regulador de la activación de la ADAM17, mediando la fosforilación en residuos de treonina en el dominio citoplasmático (Killock and Ivetic, 2010; Hall and Blobel, 2012). Es por ello que decidimos estudiar el papel de esta quinasa en la apoptosis dependiente de la ADAM17 inducida por BPA y NP.

Para evaluar la hipótesis anterior se utilizó primeramente el inhibidor de p38<sup>MAPK</sup> PD169316. Para determinar la concentración del inhibidor a utilizar, se decidió evaluar la muerte por apoptosis de células germinales tratadas con xenoestrógenos en presencia o ausencia de PD169316. La concentración del inhibidor a usar se eligió mediante una curva de concentración respuesta, cuantificando las células TUNEL positivas por túbulos seminíferos (Anexo Fig. 8). Los resultados mostraron que a una concentración de 5 y 10  $\mu\text{M}$  PD169316 se produjo una inhibición significativa en el número de células TUNEL positivo, tanto en células tratadas con BPA como con NP. A partir de estos datos determinamos que la concentración de inhibidor PD169316 a utilizar sería de 5  $\mu\text{M}$ , que corresponde a la menor concentración que reduce la muerte celular inducida por xenoestrógenos. La adición del inhibidor de p38<sup>MAPK</sup>, PD169316, directamente al testículo antes de la inyección intraperitoneal de BPA o NP previno significativamente el aumento en el porcentaje de células positivas para la ADAM17 en la superficie, a diferencia de lo visto con GW (Fig. 14). Sin embargo, PD169316 no disminuyó la intensidad de fluorescencia tanto en el tratamiento con BPA como con NP (Fig. 15), sugiriendo que p38<sup>MAPK</sup> modula la localización en superficie de la ADAM17.

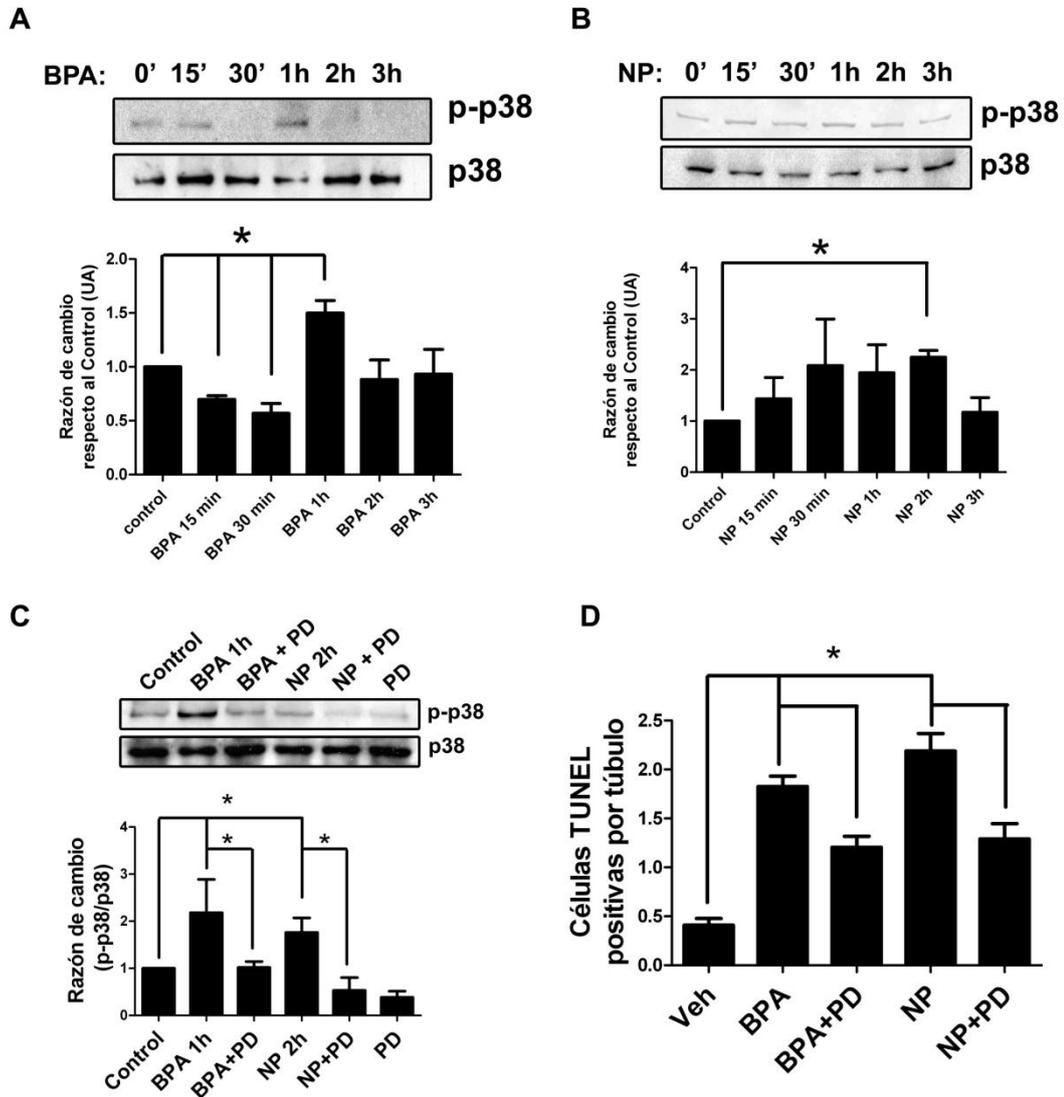
Para determinar si el inhibidor de p38<sup>MAPK</sup> previene o modifica la maduración de la ADAM17, utilizamos un anticuerpo que reconoce solo la forma activa de esta enzima. Para esto utilizamos ratas tratadas con 50 mg/kg de BPA o NP por 24 horas, las cuales fueron previamente inyectadas con uno de dos inhibidores de p38<sup>MAPK</sup>; PD169316 y SB202190, o con el inhibidor de la ADAM17, GW280264X. Al cabo del tiempo indicado, se aislaron túbulos seminíferos y evaluaron los niveles de la forma madura de la ADAM17 por medio de análisis de Western blot. La aplicación de los inhibidores de p38<sup>MAPK</sup> disminuyó los niveles de la ADAM17 madura sólo en ratas tratadas con BPA pero el efecto no fue estadísticamente significativo, mientras que la maduración de la ADAM17 inducida por NP no fue modificada por ninguno de los inhibidores (Fig. 16), lo que difiere de lo expuesto mediante citometría de flujo pero que puede ser explicado porque en la citometría se detecta la ADAM17 localizada en la superficie celular, mientras que con el análisis de Western blot se utiliza toda la célula, y por lo tanto se incluyen aquellas moléculas ADAM17 madura que no están en la superficie celular. También observamos que los inhibidores de p38<sup>MAPK</sup> redujeron la fosforilación de la ADAM17 fosforilada en treonina 735 (Anexo Fig. 6) corroborando aún más la participación de esta vía en la activación de la ADAM17 inducida por los xenoestrógenos estudiados.



**Figura 16: Los inhibidores de p38<sup>MAPK</sup> reducen los niveles de la ADAM17 madura en testículos de rata.** Ratas macho de 21 días de edad fueron inyectadas intratesticularmente con 5 $\mu$ M PD169316, 1  $\mu$ M SB202190 o 10  $\mu$ M GW280264X. Luego, fueron inyectadas con 50 mg/kg de BPA o NP y 24 horas después las ratas fueron sacrificadas para estudiar el efecto de los inhibidores sobre los niveles de la ADAM17 madura. Promedio $\pm$ SEM.

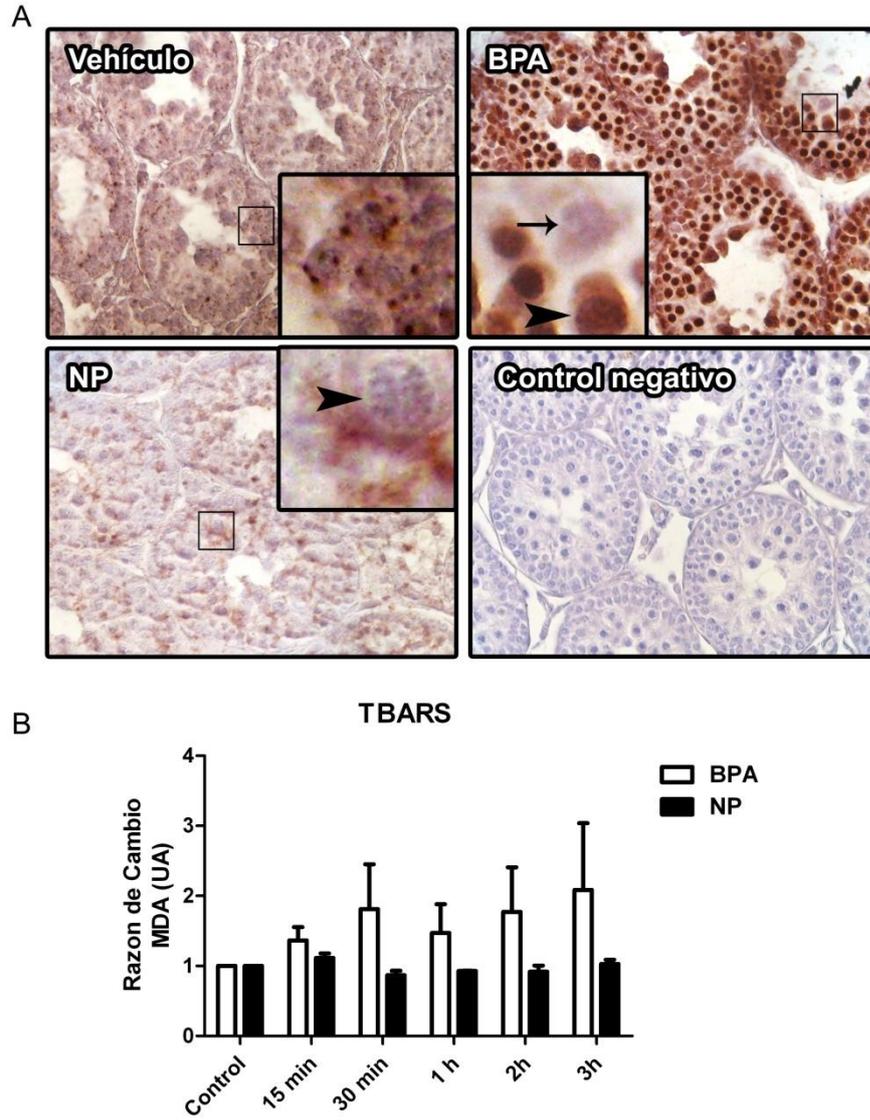
Luego evaluamos si efectivamente la quinasa p38<sup>MAPK</sup> se activa en respuesta a la aplicación de BPA o NP. Para ello se estudió el curso temporal de las inyecciones del efecto de estos xenoestrógenos en ratas de 21 días de edad (Fig. 17). La fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> disminuyó luego de 30 minutos de exposición a BPA para luego aumentar 1 hora después de la aplicación y nuevamente disminuir a las 2 y 3 horas de aplicación de este compuesto (Fig. 17A). En el caso de NP se produjo una disminución a las 3 horas, justo después del aumento a las 2 horas de aplicación (Fig. 17B). La administración de 5  $\mu$ M PD169316 redujo significativamente la fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> luego de 1 hora de la aplicación de BPA y 2 horas de la aplicación de NP (Fig. 17C). Para comprobar la participación de esta quinasa en la muerte por apoptosis de células germinales, cuantificamos el número de células TUNEL positivas después de 24 horas, observándose una reducción de un 25,6% y un 23,9%, en el caso del BPA y NP, respectivamente, en presencia del inhibidor PD169316 (Fig. 17D). Es interesante notar que la reducción de la muerte celular al inhibir p38<sup>MAPK</sup> es similar en ambos casos, sugiriendo que es una vía compartida por ambos xenoestrógenos, confirmando los resultados de citometría de flujo.

Estos resultados muestran la participación de p38<sup>MAPK</sup> como regulador de la muerte celular por apoptosis inducida por xenoestrógenos. Sin embargo, la disminución en la muerte por apoptosis no fue completa, sugiriendo que esta quinasa forma parte de una red aún más compleja de factores involucrados en esta muerte de células germinales inducida por xenoestrógenos.



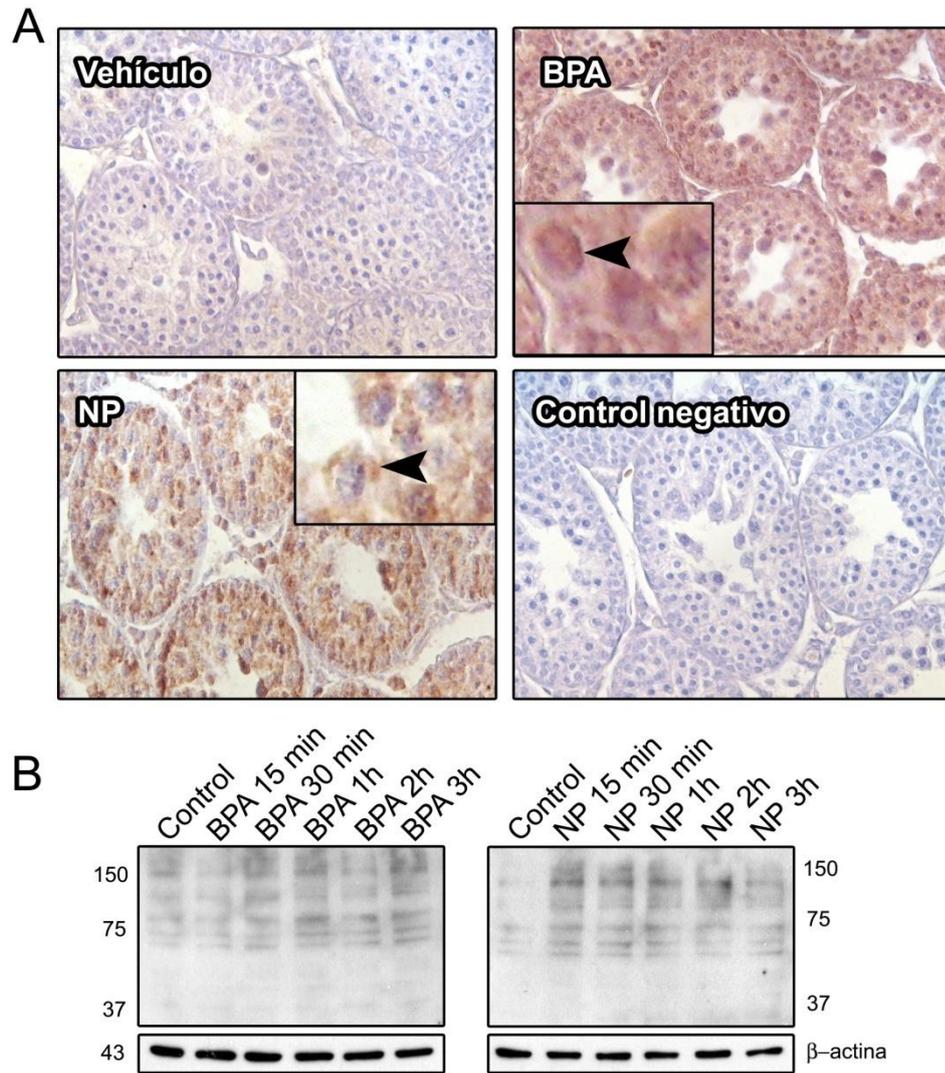
**Figura 17: Participación de p38<sup>MAPK</sup> en la muerte celular inducida por los xenoestrógenos BPA y NP.** (A y B) Análisis de Western blot de p-p38<sup>MAPK</sup> y p38<sup>MAPK</sup> en testículos de rata de 21 días después de 15 min, 30 min, 1, 2 o 3 horas de haber sido tratados con 50 mg/kg de BPA o NP. La fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> aumentó después 1 y 2 horas del tratamiento con BPA y NP, respectivamente. (C) Los niveles de fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> disminuyeron luego de la aplicación del inhibidor PD169316 en los tiempos de exposición que se observó mayor fosforilación. (D) Cuantificación de células TUNEL positivas para testículos de rata de 21 días en respuesta a la inyección de 50 mg/kg de BPA y NP con, o sin, inhibidor PD169316. \*p<0,05 con un mínimo de tres experimentos por cada tratamiento. Barras corresponden al error estándar.

Los datos en la literatura avalan que una de las vías en que la p38<sup>MAPK</sup> se activa es debido al aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROSs) (Scott et al., 2011). Si bien la forma de acción de los xenoestrógenos es por diversas vías, se ha descrito que pueden activar la generación de ROSs y por ende este mecanismo podría contribuir a la activación de la p38<sup>MAPK</sup> (Gong and Han, 2006), por lo que decidimos estudiar la presencia de ROSs y su contribución a la muerte por apoptosis de células germinales. En primer lugar, evaluamos la producción de ROSs por técnicas histológicas y bioquímicas. Para esto hicimos uso de anticuerpos que reconocen el efecto producido por ROSs, entre ellos: un anticuerpo que reconoce al malondialdehído (MDA), un producto de la peroxidación de lípidos de membrana y un anticuerpo que reconoce la nitración de proteínas. Los resultados mostraron que la inmunotinción con el anticuerpo dirigido contra el MDA se encontró restringido en pequeños cuerpos intracelulares en los cortes testículos de ratas tratadas con vehículo (Fig. 18A), pero que en aquellos tratados con BPA y NP por 24 horas, estos corpúsculos no se detectaron y se observó un aumento en la tinción citoplasmática (Fig. 18A). En el caso de las ratas tratadas con BPA también se observó un incremento en la tinción nuclear (Fig. 18A), sugiriendo que BPA y NP inducen un aumento en los niveles de MDA en testículo de rata pero en distintos compartimentos intracelulares. Además, una cuantificación de la formación de MDA mediante la técnica de TBARS en testículos de ratas tratadas con 50 mg/kg BPA o NP por distintos tiempos de exposición, se observó que sólo el BPA promovió el aumento de MDA en testículos de rata, mientras que el NP no cambió los niveles de este peroxilípido (Fig. 18B).



**Figura 18: Distribución de MDA en testículos de rata tratados con BPA o NP.**

(A) Cortes de testículo de rata de 21 días después de 24 horas de administración intratesticular del vehículo (etanol) o 50 mg /kg de BPA o NP. En testículos tratados con el vehículo se observa una localización de MDA punteada, la cual no es evidente en testículos tratados además con BPA o NP. Se observan células sin teñir en el inserto de BPA (flecha), y células completamente teñidas (Cabeza de flecha en el inserto BPA). En el caso del NP sólo se observa una tinción citoplasmática, sin núcleos teñidos (cabeza de flecha en inserto NP). (B) Cuantificación de MDA mediante TBARS en un curso temporal corto después de la aplicación de BPA o NP. Si bien se observa un aumento del MDA en el tratamiento con BPA, este no fue estadísticamente significativo. No se registraron diferencias con el tratamiento de NP. N=3. Promedio±SEM.  $p < 0,05$ .



**Figura 19: Efecto en la nitración de proteínas testiculares por los tratamientos de BPA o NP.**

(A) Inmunohistoquímica contra nitrotirosina en testículos de ratas de 21 días de edad tratadas con 50mg/kg de BPA o NP por 24 horas. El tratamiento con BPA aumentó de la inmunorreacción contra nitrotirosina en todas las células del epitelio seminífero con un patrón de tinción granular en el núcleo (cabeza de flecha en BPA), mientras que las células de testículos tratados con NP presentaron un patrón de tinción citoplasmático, sin tinción nuclear (cabeza de flecha en NP). (B) Western blot representativo de proteínas nitradas en un curso temporal en el que se observa un aumento de la nitración de proteínas (observada como un patrón de bandeo).

En cuanto a la nitración de proteínas, aquellos testículos tratados con vehículo mostraron una tinción homogénea sólo levemente más intensa que el control negativo (Fig. 19A). Por otro lado, la inyección de 50 mg/kg BPA o NP aumentó en la inmunorreacción del anticuerpo en contra de nitrotirosina en el epitelio seminífero en comparación con el vehículo (Fig. 19A). El tratamiento con BPA provocó una tinción citoplasmática y nuclear en el epitelio seminífero, esta última con un patrón granular (Fig. 19A), mientras que el tratamiento con NP provocó una tinción muy similar a la inducida por MDA (Comparar figuras 18A con 19A). Como una segunda aproximación, evaluamos la nitración de proteínas mediante western blot. Los niveles totales de proteínas nitradas aumentaron a partir de los 15 min en el caso del NP, mientras que en el caso de BPA, esto ocurrió a los 30 min (Fig. 19B). Estos resultados sugieren que efectivamente, la exposición *in vivo* de BPA o NP incrementa los niveles de ROSs y nitración de proteínas.

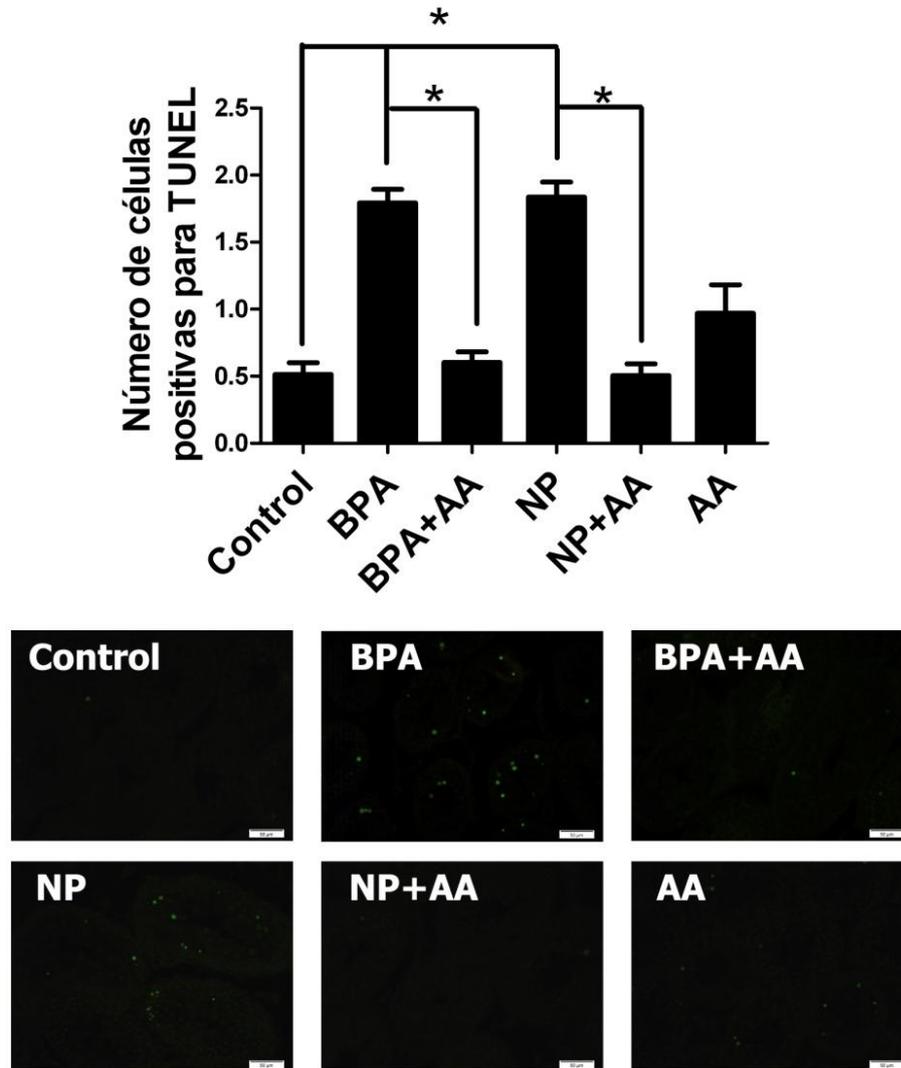
Luego estudiamos si un agente quelante de ROS previene la apoptosis de células germinales inducida por BPA o NP. Para ello, a ratas de 21 días de edad se les administraron 100 mg/kg de ácido ascórbico (AA) por vía intraperitoneal y la muerte por apoptosis de células testiculares se evaluó por medio de la técnica de TUNEL 24 horas después del tratamiento con BPA o NP. Las ratas controles mostraron un número promedio de células positivas para TUNEL por túbulo seminífero de  $0,5 \pm 0,1$ , aumentando a niveles de  $1,8 \pm 0,1$  y  $1,8 \pm 0,1$  en el caso de BPA y NP, respectivamente (Fig. 20). La aplicación de 100 mg/kg de AA previno este aumento en la muerte celular, registrándose niveles de  $0,6 \pm 0,1$  y  $0,5 \pm 0,1$ , después de la aplicación de BPA y NP, respectivamente, que son valores similares al control. La aplicación de AA sólo mostró un valor de  $0,9 \pm 0,2$  células positivas para TUNEL por túbulo seminífero, valor que no varía significativamente del

control. Estos resultados muestran que BPA y NP inducen estrés oxidativo y que este es importante en la apoptosis de células germinales en testículos de rata.

Estos datos demuestran que el estrés oxidativo es importante en la muerte celular inducida por BPA y NP en testículos de rata, el cual aumenta al poco tiempo después de la aplicación de estos compuestos y es evidente incluso 24 horas después. Este estrés puede promover la activación de kinasas como p38<sup>MAPK</sup>, que podría ser responsable de la activación de la ADAM17 en respuesta a estos compuestos.

#### ***6.4. Establecer si el aumento en los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ provocado por el BPA o NP regulan los niveles y la activación/maduración de la ADAM17.***

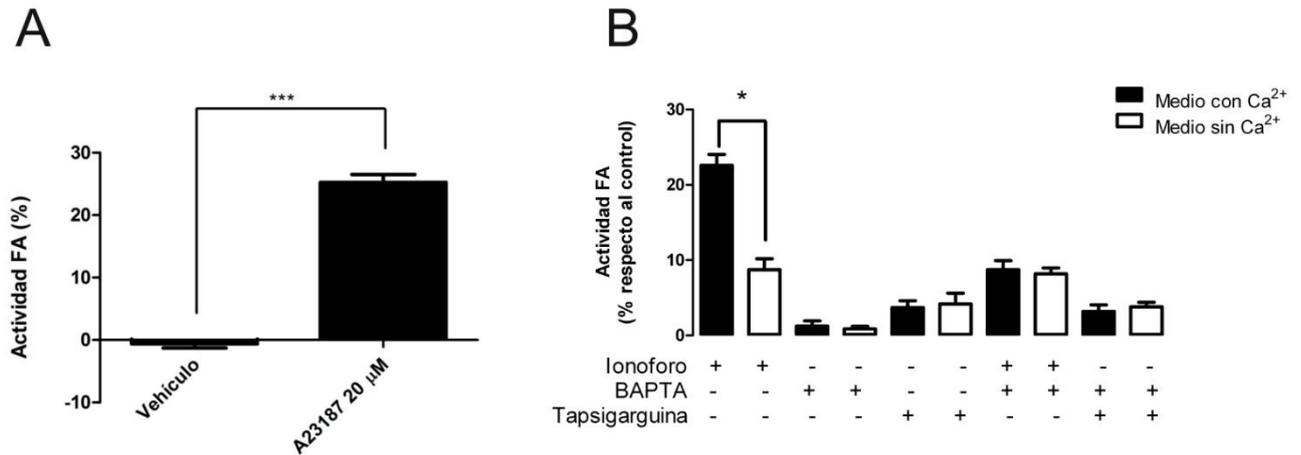
Entre los múltiples efectos que producen los xenoestrógenos se encuentra el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$ , por lo que se decidió investigar si este evento participa en la activación de la ADAM17. Para esto se utilizaron células LnCap transfectadas establemente con el plasmidio (AP)-NRG- $\beta$ 1, que nos permiten evaluar la actividad de la ADAM17. Estas células son un excelente modelo para estudiar la actividad de la ADAM17 de manera rápida, y fueron gentilmente donadas por Paulina Urriola.



**Figura 20: La muerte celular inducida por BPA o NP en testículos de rata es dependiente de estrés oxidativo.** Ratas de 21 días de edad fueron inyectadas intraperitonealmente con 100 mg/kg, 30 minutos antes de la inyección de 50 mg/kg de BPA o NP por 24 horas. El número promedio de células positivas para TUNEL por cada túbulo seminífero disminuyó significativamente. \* $p < 0,05$  y un  $N=3$ . Promedio $\pm$ SEM. Barras: 50  $\mu$ m.

El primer paso fue determinar si la  $[Ca^{2+}]_i$  se asocia con un aumento en la actividad de la ADAM17. Para esto, las células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1 fueron expuestas durante 5 minutos a 20  $\mu$ M A23187, un ionóforo de  $Ca^{2+}$ , el cual aumentó la actividad de FA un  $22,6 \pm 1,5\%$  por sobre el control (el cual está representado en el eje x, y sobre el cual están todos los valores normalizados), mientras que el vehículo no aumentó la actividad de FA (Fig. 21). Para comprobar este resultado, las células fueron expuestas a un medio con o sin  $Ca^{2+}$  por 30 minutos, e incubadas con ionóforo o tapsigarguina, un inhibidor de la SERCA que induce liberación de  $Ca^{2+}$  desde reservorios intracelulares por otros 30 minutos. Luego, las células fueron lavadas y cultivadas por 6 horas en medio DMEM-F12 sin suero fetal bovino. El ionóforo indujo un aumento de la actividad de FA en el medio de cultivo con  $Ca^{2+}$ , mientras que este efecto se redujo aproximadamente en un 60% en el medio sin  $Ca^{2+}$  (Fig. 21B), mostrando que el  $Ca^{2+}$  extracelular es importante en este proceso. En células cargadas con BAPTA-AM, un quelante de  $Ca^{2+}$ , la actividad de FA se redujo significativamente en un medio con  $Ca^{2+}$ , llegando a niveles de activación por debajo de lo visto en el medio sin  $Ca^{2+}$ , probablemente debido a que el BAPTA-AM quela todo el  $Ca^{2+}$  intracelular (incrementado por ingreso o liberación desde reservorios), mientras que en el medio sin  $Ca^{2+}$  aún existe  $Ca^{2+}$  en los reservorios internos, los que pueden afectar la actividad de la ADAM17 pero de menor manera. La incubación con 100 nM tapsigarguina indujo un aumento de solo 3,7% por sobre el control en medio con  $Ca^{2+}$  extracelular y de un 4,2% en medio libre de  $Ca^{2+}$  extracelular (Fig. 21B), por lo que se sugiere que la liberación de  $Ca^{2+}$  desde reservorios intracelulares no es importante en la activación de la ADAM17.

Estos datos son de gran importancia debido a que sólo la actividad de la ADAM10 había sido relacionada previamente con aumentos de la  $[Ca^{2+}]_i$  en otros modelos (Galichet et al., 2008; Schulz et al., 2008).



**Figura 21: Efecto del ingreso y liberación de  $Ca^{2+}$  sobre la actividad de la ADAM17.**

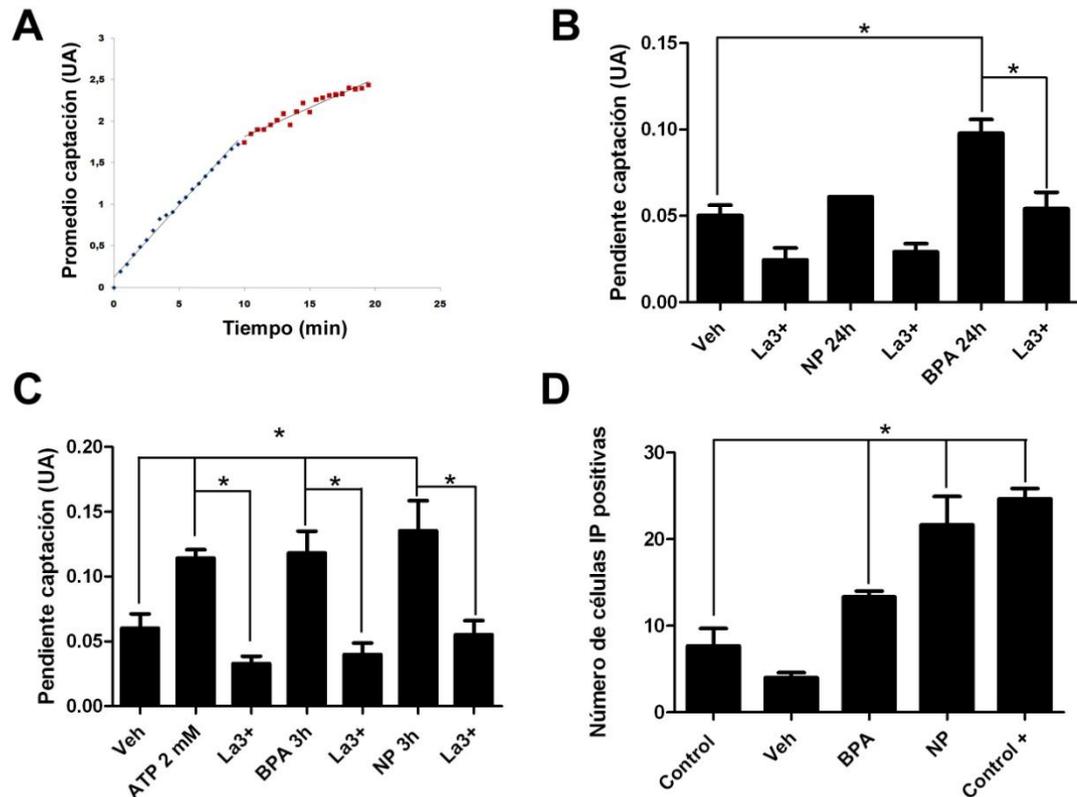
(A) Efecto de 20  $\mu$ M A23187, un ionóforo de  $Ca^{2+}$ , sobre la actividad de FA. (B) Efecto de medio extracelular con o sin  $Ca^{2+}$  en la actividad de FA, la que representa actividad de la ADAM17. BAPTA (10  $\mu$ M) y tapsigarguina (100 nM) fueron incubados por 30 minutos, tras lo cual las células fueron lavadas y puestas en medio DMEM-F12 fresco por 6 horas. Los asteriscos representan diferencias significativas,  $p < 0,05$  con un mínimo de 3 experimentos en cada tratamiento. Cada valor representa el Promedio  $\pm$  SEM.

Sabiendo que la activación de la ADAM17 se debe principalmente a un ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular, se realizaron experimentos para determinar si BPA o NP inducen la apertura de hemicanales por los cuales el  $\text{Ca}^{2+}$  pueda ingresar a la célula. Para esto, en primer lugar caracterizamos la presencia de hemicanales en las células de interés. Nuestra primera aproximación a esto fue estudiar la captación de un colorante, bromuro de etidio, en células de Sertoli aisladas, y así determinar una concentración y tiempo en los cuales analizar, posteriormente, los efectos de xenoestrógenos sobre el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por BPA o NP. La captación de colorante se realizó con un sistema de medición en tiempo real en que las células de Sertoli fueron tratadas con 10  $\mu\text{M}$  BPA o NP por 3 o 24 horas. Este experimento permite detectar los niveles de bromuro de etidio que entran a la célula mediante un estudio de la intensidad de fluorescencia de este compuesto en los núcleos de las células. Esta intensidad es graficada en función del tiempo y se presenta como velocidad de captación o pendiente de la curva de U.A. de fluorescencia en el tiempo (Fig. 22A). Los resultados indican que BPA por 24 horas indujo el ingreso de bromuro de etidio a las células de Sertoli. Al aplicar el ion lantano ( $\text{La}^{3+}$ ), un inhibidor de los hemicanales formados por conexinas, la pendiente disminuyó porque ingresa una menor cantidad de bromuro de etidio (Fig. 22A), mostrando que el ingreso del colorante es mediante hemicanales y que pueden ser activadas por BPA. Las células tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de NP durante 24 horas murieron, lo que explica la ausencia de barras de error en la barra del tratamiento con NP (Fig. 22B), por lo que tuvimos que utilizar un tiempo de estudio menor, de 3 horas, con el cual las células permanecían vivas y respondían a los compuestos (Fig. 22C). Los cultivos primarios de células de Sertoli tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de BPA o NP por 3 horas mostraron un aumento significativo en la captación de bromuro de etidio ( $0,12 \pm 0,01$  y  $0,13 \pm 0,01$  UA/min) respecto al control ( $0,06 \pm 0,01$ ), las que fueron disminuidas significativamente con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{La}^{3+}$

( $0,04\pm 0,01$  y  $0,05\pm 0,01$  UA/min, en el caso de BPA y NP, respectivamente) (Fig. 22C). Como control positivo se utilizó ATP 2 mM, el cual activa receptores purinérgicos (P2Y o P2X), induciendo la apertura de hemicanales formados por pannexinas (Locovei et al., 2006; Delarasse et al., 2011). El conteo del número de células para cada tratamiento indica que el número de células que captan colorante aumenta en presencia de BPA o NP (Fig. 22D) desde  $7,7\pm 2,0$  células a  $13,3\pm 0,67$  y  $21,7\pm 1,20$  células por campo en el caso de BPA y NP, respectivamente.

Luego, evaluamos el posible aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  después de la aplicación de BPA o NP a células de Sertoli en cultivo, utilizando las mismas variables descritas anteriormente. Las células fueron incubadas por 3 horas en un medio que tenía 10  $\mu$ M BPA o NP, para luego medir la  $[Ca^{2+}]_i$  utilizando FURA2-AM durante 20 minutos, dentro del mismo curso temporal que se evaluó la captación de colorante. Después de 3 horas de tratamiento, tanto el BPA como el NP aumentaron la señal de FURA2-AM en células de Sertoli (Fig. 23A), lo que concuerda con lo expuesto previamente en la literatura (Hughes et al., 2000; Nadal et al., 2000; Quesada et al., 2002; Watson et al., 2005; Watson et al., 2007; Gong et al., 2008; Michelangeli et al., 2008). El análisis del área bajo la curva mostró que en las células tratadas con BPA, este parámetro disminuyó significativamente con la aplicación de  $La^{3+}$  (de  $39,9\pm 18,3$  a  $22,6\pm 6,5$  unidades arbitrarias, calculadas como la integral de la curva basada en el valor basal) (Fig. 23B). En el caso de NP disminuyó de  $43,0\pm 8,4$  a  $13,0\pm 2,2$  unidades, pero no fue estadísticamente significativa. Este análisis se realizó tomando como base el primer minuto de medición, por lo que el área total bajo la curva de cada medición fue normalizada con su medición basal, explicando así que se observe una disminución en el área total. Esto se debe a que la  $[Ca^{2+}]_i$  a subir en el

momento de la medición en el caso del BPA, por lo que no se puede fijar un valor basal para todas las mediciones.

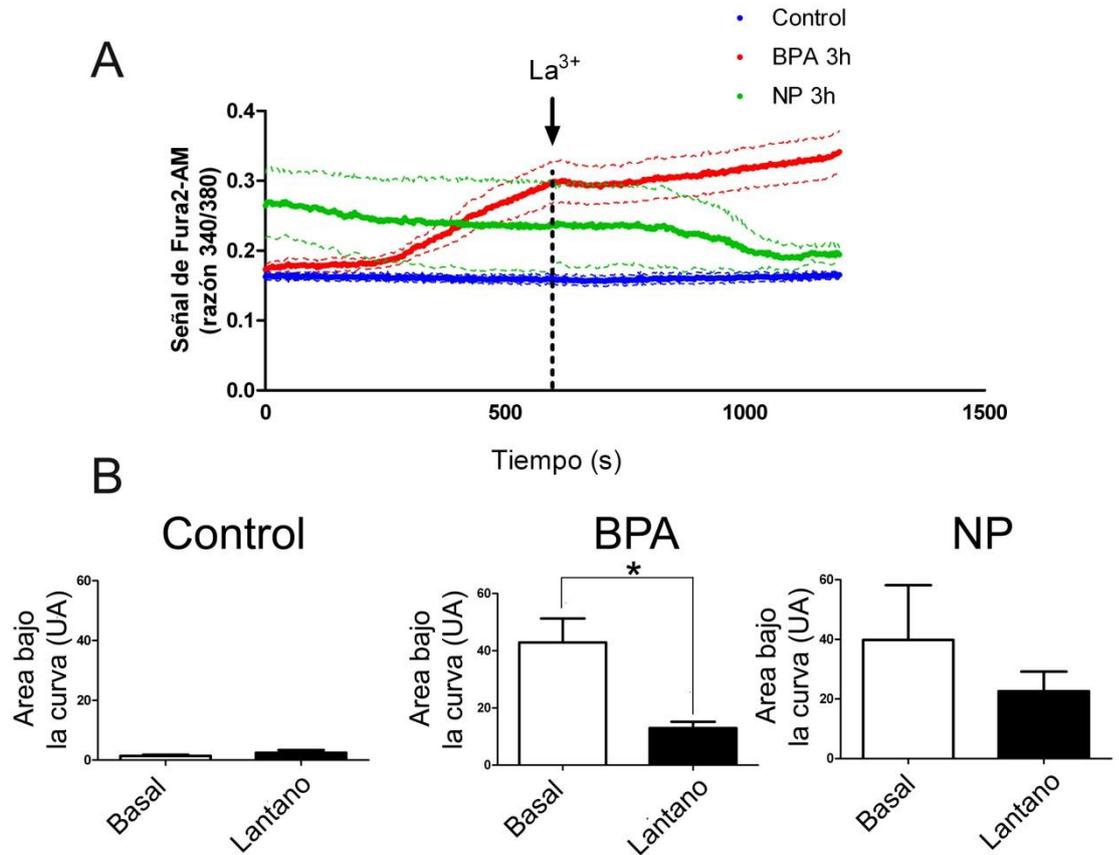


**Figura 22: Captación de bromuro de etidio por cultivos primarios de células de Sertoli.**

(A) Gráfico representativo de la captación de bromuro de etidio por células de Sertoli en cultivo y tratadas con NP 10  $\mu\text{M}$  por 3 horas. La pendiente inicial indica la captación en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de NP por 3 horas, mientras que la pendiente más baja es la captación al agregar 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{La}^{3+}$  (inhibidor de hemicanales). Estas dos pendientes (inicial e inhibida) son graficadas en los paneles (B) y (C). (B) Gráfico de las pendientes obtenidas como en (A) de los tratamientos de 10  $\mu\text{M}$  BPA o NP por 24 horas. Existe un aumento significativo respecto al vehículo en la captación de bromuro de etidio en las células tratadas con BPA. Sin embargo, a las 24 horas mueren las células tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de NP, por lo se optó por un nuevo tiempo de estudio. (C) Los mismos tratamientos que en (B) pero a las 3 horas, y además se agregó un control positivo de ATP (2mM). Se observa un aumento significativo en la captación de bromuro de etidio con BPA y NP respecto al vehículo. En (D) se realizó un conteo del número de células positivas para yoduro de propidio (IP), otro colorante, con los distintos tratamientos. Todos los experimentos tienen un mínimo de 3 repeticiones. \* $p < 0,05$  con respecto al vehículo o control. Barras corresponden al error estándar.

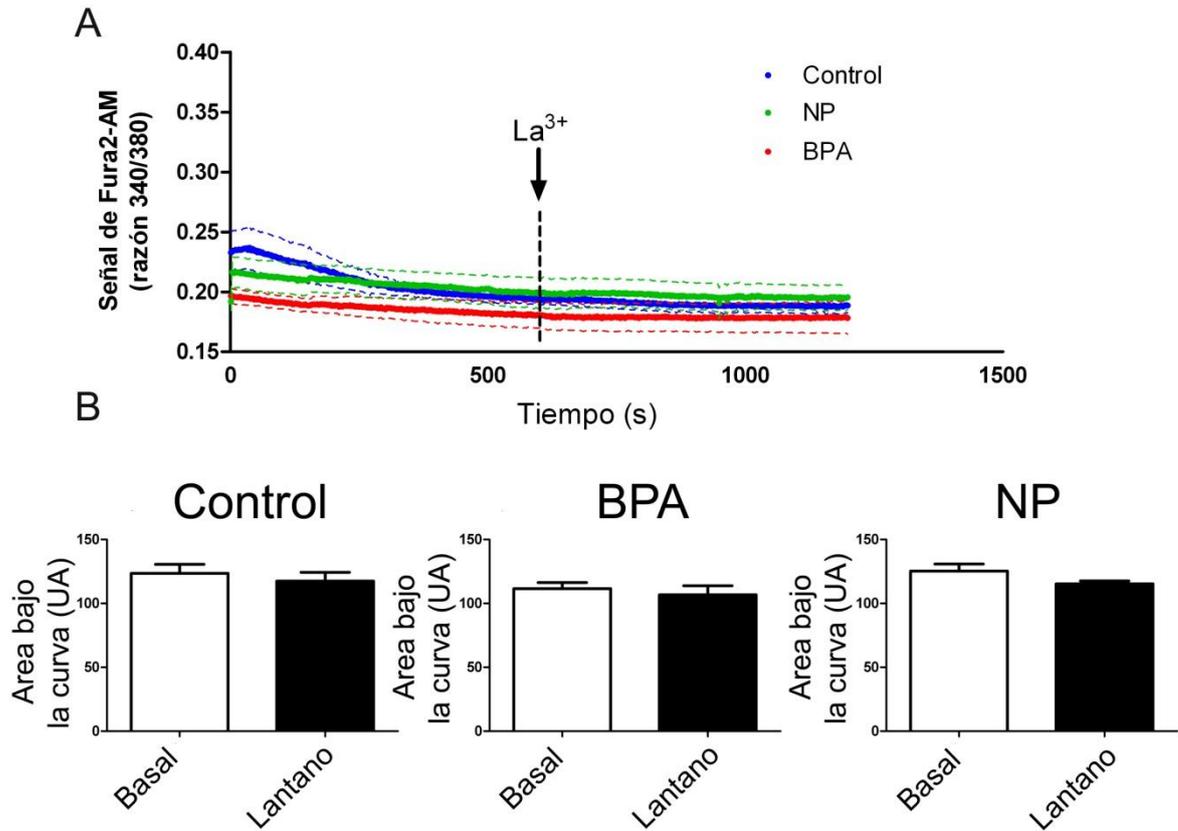
De esta forma comprobamos que las células de Sertoli en cultivo responden a xenoestrógenos con un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Por lo tanto, se estudió si las células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1, en las cuales se estudió la actividad de FA, presentan el mismo comportamiento. Las células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1 fueron tratadas de la misma forma que las células de Sertoli en cultivo. A diferencia de las células de Sertoli, en las células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1 no aumentó la  $[Ca^{2+}]_i$  después de 3 horas de exposición a BPA o NP (Fig. 24A), ni cambió el área total bajo la curva (Fig. 24B), mostrando que estas células no se comportan de la misma forma que células de Sertoli primarias en cultivo. A diferencia del análisis en células de Sertoli, como base para la medición del área total bajo la curva se usó el valor 0 en la señal de FURA2-AM, eso explica los altos valores de área en comparación con lo visto en células de Sertoli, sin ser esto de importancia para el resultado final.

Para determinar si los tiempos de exposición a xenoestrógenos eran demasiado largos como para detectar un posible aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , decidimos estudiar la  $[Ca^{2+}]_i$  de manera instantánea. Para esto, las células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1 fueron cargadas con FURA2-AM de la misma forma anterior, pero la  $[Ca^{2+}]_i$  fue evaluada mientras se añadían los estímulos de xenoestrógenos (Fig. 25A y B), después de cada aplicación se registró durante 300 segundos. Como última condición se añadió  $La^{3+}$  para comprobar si los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  eran mediados por hemicanales. Como control positivo utilizamos 500  $\mu$ M ATP, el cual es un estímulo que aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  en otros tipos celulares (Orellana et al., 2012). Sin embargo, este estímulo no aumentó la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células LnCap (Fig. 25C). Luego se evaluó si ATP activa la ADAM17 en estas células. Para esto realizamos una curva temporal en respuesta a la aplicación de 500  $\mu$ M ATP por 15 min, 30 min, 1 hora, 3 horas y 6 horas, y evaluamos el medio de cultivo de estas células para detectar la actividad de FA.



**Figura 23:** La  $[Ca^{2+}]_i$  en células de Sertoli en cultivo tratadas con BPA o NP es disminuida por la aplicación  $La^{3+}$ .

(A) Las células de Sertoli fueron expuestas a  $10 \mu M$  BPA o NP durante 3 horas, tras lo cual fueron cargadas con FURA2-AM y la  $[Ca^{2+}]_i$  fue medida durante 10 minutos, para luego agregar  $200 \mu M$   $La^{3+}$  (flecha) y medir la  $[Ca^{2+}]_i$  durante otros 10 minutos. (B) Análisis de áreas bajo la curva antes y después de la aplicación de  $La^{3+}$  (Lantano). Las mediciones representan el promedio de un mínimo de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ . Barras corresponden al error estándar.



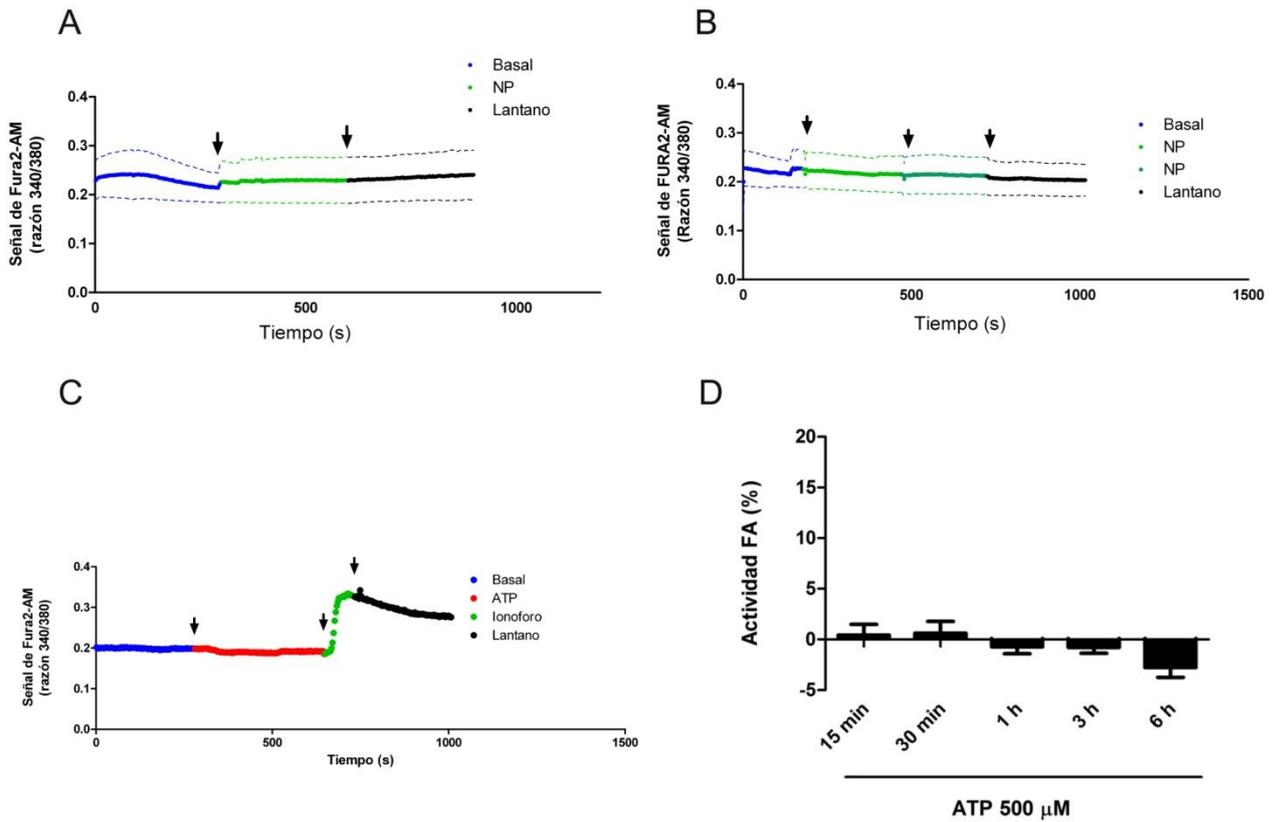
**Figura 24: La  $[Ca^{2+}]_i$  no cambia en células LnCap tratadas con BPA o NP.**

(A) Señal de FURA2-AM en células LnCap expuestas a 10  $\mu$ M BPA o NP durante 3 horas, tras lo cual fueron cargadas con FURA2-AM para medir la  $[Ca^{2+}]_i$  durante 20 minutos. Los 10 primeros minutos corresponden al valor del efecto de BPA o NP, tras lo cual se aplicó una dosis de  $La^{3+}$  200 $\mu$ M. La aplicación de  $La^{3+}$  (flecha) no produjo cambios. (B) Análisis de área total bajo la curva antes y después de la aplicación de  $La^{3+}$  (200  $\mu$ M, Lantano). Las mediciones representan el promedio de un mínimo de 3 experimentos independientes. Barras corresponden al error estándar. No se detectaron diferencias significativas.

Al igual que lo visto previamente, el ATP no aumentó la actividad de FA en el medio de cultivo de estas células, sugiriendo que la ADAM17 no fue activada (Fig. 25D). El ATP induce su efecto a través de receptores purinérgicos del tipo P2Y y P2X, los cuales pueden estar acoplados, física y/o funcionalmente, a hemicanales formados por pannexinas (Locovei et al., 2006; Pelegrin and Surprenant, 2009). Las pannexinas son proteínas de membrana, de las cuales se han descrito tres miembros; Panx1, Panx2 y Panx3. Estas proteínas, a pesar de presentar algunas propiedades funcionales, no presentan homología en su estructura primaria, pero sí tienen homología de secuencia con las inexas, subunidades proteicas de las uniones en hendidura de los insectos (Penuela et al., 2012). Las pannexinas están involucradas con la propagación de ondas de  $Ca^{2+}$ , respuesta inmune y apoptosis (Penuela et al., 2012). Diferentes reportes indican que las células LnCap expresan Panx1 (Vanden Abeele et al., 2006), sin embargo, decidimos investigar si las células utilizadas en el presente trabajo, células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1, expresan estas proteínas, con lo que se podría explicar en parte, la ausencia de respuesta a ATP. Si bien estos autores aseguran la existencia de mRNA de la Panx1 en las células LnCap, sus resultados muestran falsos positivos, debido a que el control negativo en la detección de esta proteína en células LnCap presenta una banda claramente detectable, con lo que se debilitan sus conclusiones (Vanden Abeele et al., 2006). Además, los autores muestran resultados similares a los descritos aquí respecto a que las células LnCap no responden a ATP (Fig. 25 C y D). Por lo tanto, posiblemente la falta de respuesta a ATP de las células LnCap se debe a la ausencia de pannexinas, lo que nos permitiría sugerir que las pannexinas podrían estar involucradas en el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por xenoestrógenos en los otros tipos celulares. Experimentos preliminares muestran que nuestro anticuerpo utilizado en el presente trabajo no detecta la Panx1 en células LnCap pero sí la detecta en testículo y cerebro de rata (Anexo Fig. 9). Además, se detectó el

mRNA de Panx1 sólo en testículo de rata y no en células LnCap (Anexo Fig. 9D). Las Panxs 2 y 3 fueron detectadas en células LnCap. Esto fue comprobado por inmunofluorescencia en microscopía confocal, obteniéndose el mismo resultado (Anexo Fig. 10), no detectándose Panx1 en células LnCap. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las células LnCap no responden a ATP, posiblemente porque no expresan receptores P2X y/o canales formados por Panx1. Luego de esto se decidió estudiar el posible incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en células germinales, ya que son el modelo de estudio principal y corresponden a las células que mueren en presencia de xenoestrógenos.

Debido a la imposibilidad de mantener células germinales en cultivo primario, estas se purificaron mediante un gradiente de BSA que permite separar y purificar espermatocitos en paquiteno y espermátidas redondas, principalmente. Los otros tipos celulares no pueden ser separados con una alta pureza por este sistema, sin embargo, si es posible obtener fracciones de mezclas de espermátidas redondas y elongadas. Aún así, los espermatocitos en paquiteno y espermátidas redondas corresponden al mayor porcentaje de células dentro de los túbulos seminíferos, por lo que son las dos fracciones más importantes y, justamente, las que poseen mayor pureza. En estas células midió la  $[Ca^{2+}]_i$  en una población de células en suspensión utilizando un fluorímetro. Las células fueron incubadas con 5  $\mu$ M FURA2-AM por 45 minutos en medio KH, y posteriormente fueron lavadas tres veces utilizando el mismo medio y puestas en cubetas de plástico. Se midió el valor basal por 100 segundos, tras lo cual se agregó el vehículo (etanol), y se dejó por 200 segundos adicionales antes de aplicar 10  $\mu$ M NP. Fue muy interesante ver que los espermatocitos y las espermátidas respondieran al NP aplicado en forma aguda (Figs. 26 y 27).



**Figura 25: Evaluación de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la actividad de la ADAM17 en células LnCap tratadas con ATP.** (A) Aplicación aguda de 10  $\mu$ M de NP (flecha y segmento verde) en células LnCap. Aplicación de  $La^{3+}$  200 $\mu$ M (flecha y segmento negro). (B) Aplicaciones agudas y seguidas de 10  $\mu$ M NP (flechas verde y verde claro) en células LnCap. Aplicación de  $La^{3+}$  200 $\mu$ M (flecha y segmento negro). (C) Aplicación de 500  $\mu$ M ATP (Flecha y segmento rojo) en células LnCap. La aplicación de ionoforo A23187 20 $\mu$ M aumentó la  $[Ca^{2+}]_i$  (flecha y segmento verde). Aplicación de  $La^{3+}$  200 $\mu$ M (flecha y segmento negro). (D) Las células LnCap transfectadas con sustrato de la ADAM17 no respondieron a 500  $\mu$ M de ATP. Las mediciones representan el promedio de un mínimo de 3 experimentos independientes. Barras corresponden al error estándar. Las flechas indican el momento de la aplicación del compuesto definido por el color del segmento.

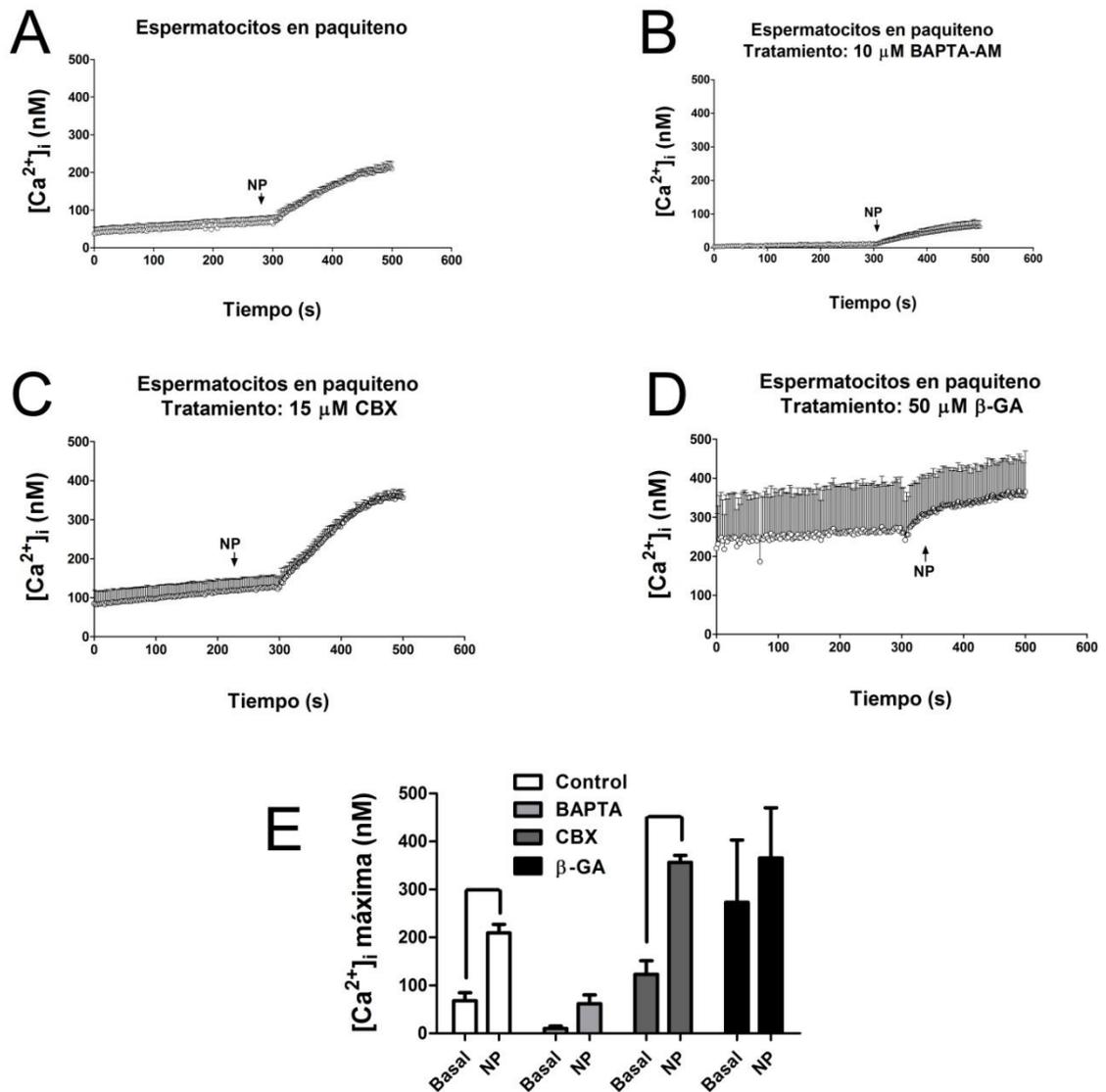
Los espermatoцитos en paquiteno mostraron un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  desde  $68,1 \pm 16,7$  nM (que corresponde a la concentración máxima antes de la aplicación de NP) a un  $209,5 \pm 17,6$  nM, siendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). En espermatoцитos preincubados con BAPTA-AM, se registró una  $[Ca^{2+}]_i$  máxima de  $10,1 \pm 5,2$  nM, que al agregar NP aumentó a  $62,1 \pm 18,2$  nM, sin ser estadísticamente significativas. La preincubación de carbenoxolona (CBX) ( $15 \mu\text{M}$ ), inhibidor de hemicanales formados por Panx1, produjo un aumento significativo desde un basal máximo de  $123,0 \pm 28,4$  nM a un  $356,5 \pm 14,6$  nM al aplicar el NP, sugiriendo que la Panx1 podría no estar involucrada en la respuesta a NP. La pre-incubación con 18- $\beta$ -glycyrrhetic acid ( $\beta$ -GA) aumentó la  $[Ca^{2+}]_i$  basal, llegando a  $273,1 \pm 130,1$  nM, mientras que después de la aplicación de NP se registró una concentración máxima de  $365,4 \pm 104,6$  nM. Este último resultado indica que la inhibición de los hemicanales formados por pannexinas o conexinas aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  basal en células germinales, la que aumentó aún más en presencia de xenoestrógenos como el NP. Lo que sugiere que los hemicanales podrían representar una vía de salida de  $Ca^{2+}$  desde la célula, que se bloquea al inhibir estos hemicanales, manteniendo un nivel de la  $[Ca^{2+}]_i$  elevada desde un comienzo.

En cuanto a las espermátidas redondas en suspensión (Fig. 27), el NP aumentó la  $[Ca^{2+}]_i$  máxima desde un  $107,5 \pm 26,3$  nM en el basal a un máximo de  $266,5 \pm 87,5$  nM, pero no fue una diferencia estadísticamente significativa. Sólo al pre incubar con BAPTA-AM se registró una diferencia estadísticamente significativa desde un basal de  $27,3 \pm 4,9$  nM a un  $74,0 \pm 6,7$  nM después de la aplicación de  $10 \mu\text{M}$  NP, valores muy por debajo del control. Al pre incubar con CBX o  $\beta$ -GA, no se registraron diferencias significativas tras la aplicación de NP comparando el basal con la aplicación de NP, observándose valores máximos de  $115,4 \pm 31,00$  y  $746,8 \pm 508,8$  nM a  $193,1 \pm 60,33$  y  $872,5 \pm 551,6$  nM, para el

caso de CBX y  $\beta$ -GA, respectivamente. Lo que concuerda con lo observado en espermatoцитos aislados.

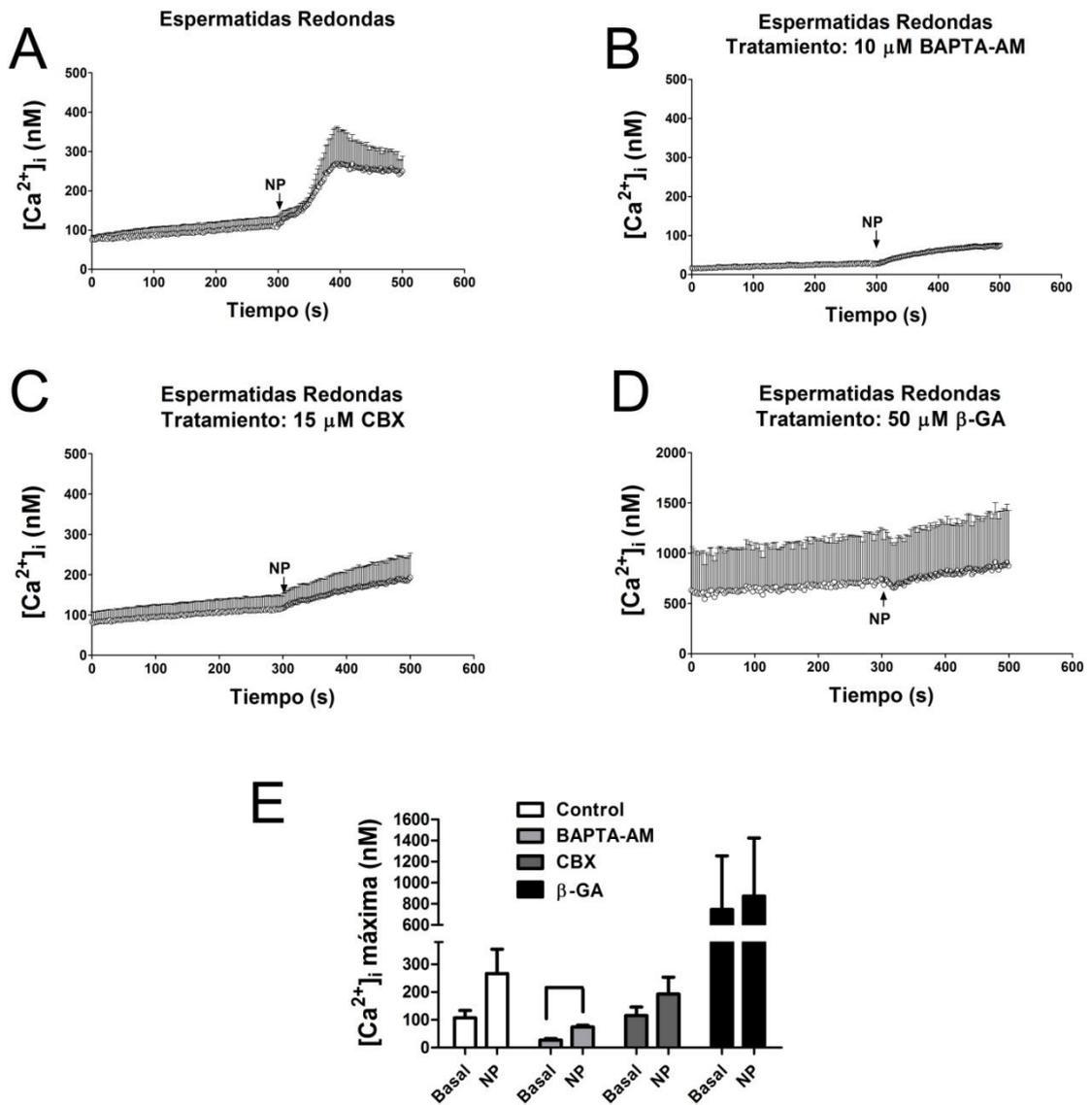
Los resultados anteriores muestran que las células germinales aisladas y en suspensión responden a NP con un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , y sugieren que este aumento podría explicar la muerte celular observada en los estudios *in vivo*, provocando una activación de la ADAM17, la cual responde a  $[Ca^{2+}]_i$  en experimentos *in vitro* (Fig. 21). Para comprobar esto en las células germinales aisladas, realizamos citometría de flujo de la ADAM17 en la superficie celular de las mismas células que fueron utilizadas para la medición de la  $[Ca^{2+}]_i$ , de la misma forma que se detalló anteriormente, y observamos que, efectivamente, la adición de 10  $\mu$ M NP aumentó la intensidad de fluorescencia de la ADAM17 en espermatoцитos y espermátidas (Fig. 28), sin embargo, no fue estadísticamente significativo.

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de FITC (molécula fluorescente acoplada al anticuerpo secundario) indica que los distintos tratamientos usados (BAPTA, CBX y  $\beta$ -GA) no revirtieron el aumento de intensidad de fluorescencia de FITC inducido por NP (Fig. 28). Sugiriendo fuertemente que el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por NP no tiene relación con la actividad de la ADAM17, lo que no implica que este aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  no active esta metaloproteasa, como ya vimos anteriormente (Fig. 21).



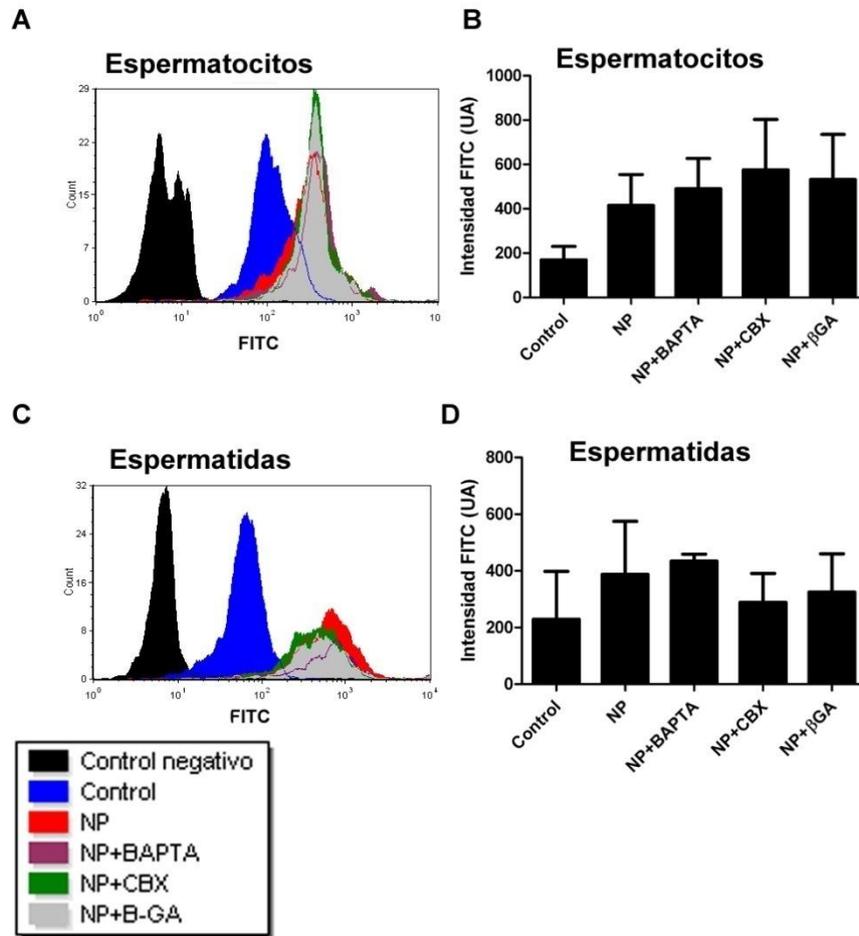
**Figura 26: Los xenoestrógenos inducen un aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en espermatoцитos en paquiteno aislados y en suspensión.**

Niveles basales y después del tratamiento con 10 μM NP a espermatoцитos en paquiteno en condiciones control (A), preincubados con BAPTA-AM (B), 5 μM CBX (C) o β-GA (D). (E) Promedio de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> máximas en las distintas condiciones. N=3, cada valor corresponde al promedio±SEM; p<0,05, líneas representan diferencias significativas.



**Figura 27: Los xenoestrógenos inducen un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en espermatidas redondas aisladas y en suspensión.**

Niveles de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal y después del tratamiento de 10  $\mu\text{M}$  NP de espermatidas redondas en condiciones control (A), pre incubadas con BAPTA-AM (B), 5  $\mu\text{M}$  CBX (C) o  $\beta$ -GA (D). (E) Promedio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  máximas en las distintas condiciones. N=3, cada valor corresponde al promedio  $\pm$  SEM;  $p < 0,05$ , líneas representan diferencias significativas.

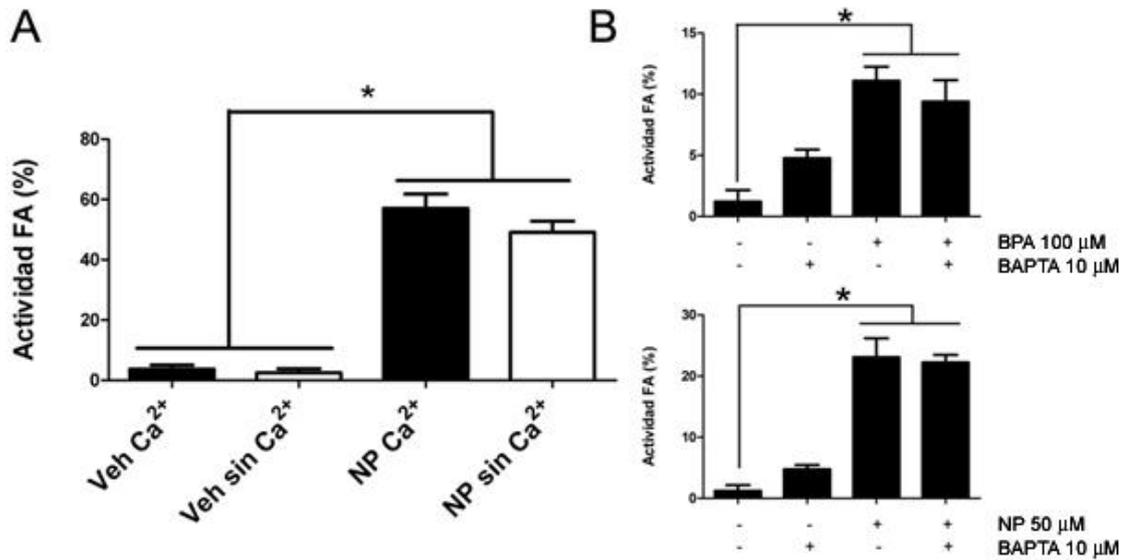


**Figura 28: Intensidad de fluorescencia de la ADAM17 en la superficie de espermatocitos y espermátidas aisladas.**

(A) y (B) Células espermáticas aisladas mediante gradiente de BSA fueron incubadas con  $5\mu\text{M}$  FURA-AM para la medición de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Posterior a esto, las células fueron incubadas con un anticuerpo contra la ADAM17 madura que reconoce esta proteína por su extremo N-terminal. Las células portando la ADAM17 en su superficie fueron medidas mediante citómetro de flujo. (A) y (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de espermatocitos aislados. (C) y (D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de espermátidas redondas aisladas. Estos datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo de las células de las figuras 25 y 26. Promedio $\pm$ SEM. N=3.

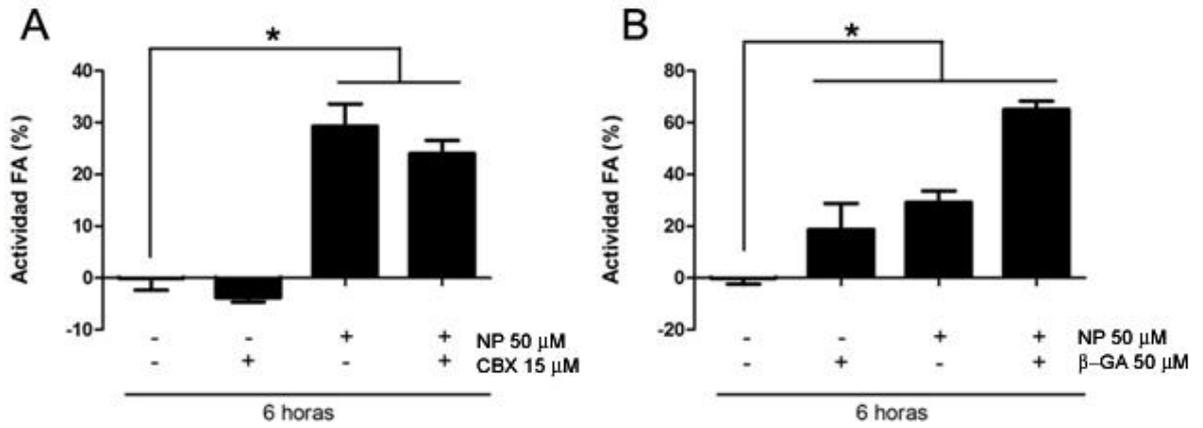
Para comprobar estos resultados realizamos mediciones de la actividad de la ADAM17 en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1, con el fin de determinar si el  $\text{Ca}^{2+}$  participa de la actividad de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos. NP indujo un aumento significativo en la actividad de FA, en un medio completo como en uno sin  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 29A). Además, la presencia del quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , BAPTA-AM, no redujo la actividad de la ADAM17 inducida por BPA o NP (Fig. 29B). Estos resultados indican claramente que el  $\text{Ca}^{2+}$  no participa en la inducción de la actividad de la ADAM17 inducida por NP o BPA en células LnCap, y parece ser lo mismo en células germinales.

Para determinar si los hemicanales de pannexinas o conexinas están involucrados en la actividad de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos, utilizamos las células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1, las que tratamos con 10  $\mu\text{M}$  de NP en presencia o ausencia de inhibidores de hemicanales formados por pannexinas (CBX) (Fig. 30A), o por pannexinas y conexinas ( $\beta$ -GA) (Fig. 30B), observándose que no existió una disminución en la actividad de FA (que representa la actividad de la ADAM17) en presencia del NP y los inhibidores. De hecho, se observó un aumento significativo de la actividad de la ADAM17 en presencia de NP y  $\beta$ -GA, que puede deberse al aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en presencia de  $\beta$ -GA observado en las figuras 26 y 27.



**Figura 29: Actividad de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos en presencia de medio con o sin Ca<sup>2+</sup> y del uso del quelante de Ca<sup>2+</sup>, BAPTA-AM.**

(A) La actividad de la ADAM17 inducida por NP no es reducida por el uso de un medio libre de Ca<sup>2+</sup> en células LnCap (AP)-NRG-β1. (B) El uso del quelante BAPTA-AM, no redujo la actividad de la ADAM17 inducida por BPA o NP. Resultados obtenidos con un mínimo de 3 experimentos independientes. Barras corresponden al error estándar. Asteriscos indican diferencias significativas, p<0,05.



**Figura 30: Los HCs formado por pannexinas o conexinas no median la activación de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos. En las células LnCap (AP)-NRG-β1.**

(A) El inhibidor de pannexinas, CBX (15 μM), no redujo la actividad de la ADAM17 inducida por NP. (B) El inhibidor general de hemicanales, βGA, no redujo la actividad de la ADAM17 inducida por NP, de hecho, la aumentó significativamente. Resultados con un mínimo de 3 experimentos cada uno. Barras corresponden al error estándar. \* $p < 0,05$ .

Estos resultados sugieren fuertemente que los hemicanales formados por pannexinas o conexinas no participan en la activación de la ADAM17 inducida por NP. Si bien un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta la actividad de la ADAM17 y los xenoestrógenos, como el NP, inducen un aumento de la  $Ca^{2+}$ , no podemos concluir que este  $Ca^{2+}$  provenga de una activación de hemicanales en respuesta a estos compuestos.

## 7. Discusión

Se ha demostrado que la ADAM17 participa en la muerte por apoptosis de células germinales en condiciones fisiológicas e inducidas (Lizama et al., 2010b; Lizama et al., 2011), y que la ADAM10 y la ADAM17 son sobre-reguladas por DEHP (Yao et al., 2009), pero nunca se ha probado la participación de las proteínas de ADAM en la muerte por apoptosis de células germinales, o en ningún otro proceso, inducido por BPA y NP. Este trabajo nos proporciona claras evidencias de que las proteínas ADAMs tienen una importante participación en la respuesta a xenoestrógenos, ofreciendo un nuevo mecanismo de acción de estos compuestos.

### 7.1. Análisis del efecto de los xenoestrógenos sobre la muerte celular

En el presente trabajo se demostró que una única inyección de BPA o NP aumenta el número de células germinales apoptóticas (Figs. 1, 2, 3, 4 y 7), lo cual sólo había sido probado utilizando grandes cantidades de estos compuestos y por largos tiempos de exposición a ellos (Han et al., 2004; McClusky et al., 2007; Li et al., 2009; Nakamura et al., 2010), lo que demuestra que estos compuestos sí tienen un efecto negativo en pequeñas concentraciones y en tratamientos agudos. La muerte por apoptosis de las células germinales se midió utilizando diversas técnicas; TUNEL, activación de la caspasa-3, población subG1 de células testiculares y recuentos histológicos, que indican claramente que los xenoestrógenos inducen muerte celular por apoptosis. Entre estas técnicas se pueden encontrar algunas diferencias en cuanto a la magnitud de un evento, sin embargo,

la relación que existe entre el tratamiento *versus* el control o vehículo se mantiene. Es lo que sucede en el recuento de células positivas a caspasa-3 activa comparado con los recuentos de células positivas a TUNEL en la Fig. 2. La diferencia en el número de células positivas para caspasa-3 activa y TUNEL (Fig. 2) puede ser explicada debido a que las células positivas para TUNEL corresponden a aquellas con DNA fragmentado, las cuales ya entraron en el proceso apoptótico, mientras que las células positivas para caspasa-3 tienen la posibilidad de entrar a la apoptosis o reparar el daño y salir de aquel proceso, lo que explica que el número de estas células positivas para TUNEL sea alrededor de 10 veces menos (comparar Figs. 2B y 2D) en comparación al número de células positivas para caspasa-3. Además, la caspasa-3 también puede estar involucrada en procesos distintos a la muerte celular, como desarrollo del sistema nervioso, reconocimiento del canto en aves (Huesmann and Clayton, 2006) y es un participante del desarrollo terminal de las espermátidas en testículo de mosca (Arama et al., 2006). Otra posible explicación es que la constante fagocitosis por parte de las células de Sertoli a aquellas células en apoptosis (Wang et al., 2006), hace que el número de células apoptóticas (TUNEL) identificables en un corte de testículo sea relativamente bajo, en comparación con aquellas células que no han entrado en apoptosis pero que sí presentan características apoptóticas (como caspasa-3 activa).

**Tabla 2: Porcentajes de inhibición de la muerte celular *in vivo* inducida por distintos inhibidores y antioxidantes**

	<b>Inhibidor</b>							
	<b>GW</b>		<b>GI</b>		<b>PD</b>		<b>AA</b>	
Xenoestrógeno	<b>BPA</b>	<b>NP</b>	<b>BPA</b>	<b>NP</b>	<b>BPA</b>	<b>NP</b>	<b>BPA</b>	<b>NP</b>
Porcentaje de inhibición (%)	<b>57,1</b>	<b>49,1</b>	<b>-31,3</b>	<b>-18,1</b>	<b>25,6</b>	<b>23,8</b>	<b>66,6</b>	<b>72,3</b>

## **7.2. Análisis del efecto de los xenoestrógenos sobre proteínas ADAM**

Respecto al efecto sobre las proteínas ADAMs, se produce un aumento significativo en los niveles de la proteína ADAM10 (Fig. 9), pero el inhibidor específico de la ADAM10 (GI254023X) no previene completamente el aumento del índice de apoptosis inducido por los xenoestrógenos (Fig. 4 y Tabla 2), incluso cuando este inhibidor se aplica antes de la inyección de NP o BPA, se produce un ligero aumento (estadísticamente no significativo) en la apoptosis de células germinales (Fig. 4B), sugiriendo que el inhibidor de la ADAM10 podría tener efectos negativos sobre la espermatogénesis. Sin embargo, la sola aplicación del inhibidor de la ADAM10 no provoca muerte celular (Fig. 4C). Si bien GI254023X es el inhibidor específico de la ADAM10, GW280264X inhibe tanto la ADAM10 como la ADAM17 (Hundhausen et al., 2003; Lizama et al., 2011), y sólo GW280264X reduce el índice de apoptosis inducido por BPA o NP, medido por el ensayo TUNEL (Fig. 4A y Tabla 2) y por el clivaje de PARP (Fig. 6C), lo que demuestra la participación de la ADAM17 en la apoptosis de células germinales y también sugiere que los xenoestrógenos podrían aumentar la actividad de la ADAM17, pero no de la ADAM10.

Es interesante observar que en testículos de ratas tratadas con 50 mg/kg de BPA se observen espacios vacíos entre los túbulos (Fig. 11), ya que esto puede significar que a pesar de no cambiar la tinción para la ADAM17 madura, el tratamiento podría afectar la fisiología del testículo disminuyendo el número de células de Leydig, las cuales se ubican en el espacio intersticial, interfiriendo así con la producción de testosterona y, de esta forma, afectando negativamente las células germinales. Sin embargo, como la inhibición de la ADAM17 disminuyó la muerte celular por apoptosis, por lo cual es probable que no sea la disminución en la producción de testosterona el gatillante de la muerte, además, el tiempo de estudio es muy corto para observar un efecto negativo como consecuencia de la disminución de los niveles hormonales como ha sido observado por otros autores (Li et al., 2009).

Las proteínas ADAMs, especialmente la ADAM17, han sido relacionadas con muerte celular inducida por drogas (Lizama et al., 2010a; Lizama et al., 2010b; Moreno et al., 2011; Lizama et al., 2012), y en el presente trabajo se demostró que también responden a contaminantes ambientales como los xenoestrógenos. Sin embargo, aún queda por demostrar el mecanismo por el cual los xenoestrógenos activan la ADAM17.

El inhibidor de la ADAM17, GW280264X, disminuye el número de células portando la ADAM17 en su superficie inducido por BPA en comparación con el tratamiento con solo BPA, pero no en el tratamiento con NP. Esto sugiere que el BPA activa una vía que participa en la translocación de la ADAM17 a la superficie de la célula o que GW280264X tiene otro blanco molecular (además de la ADAM17), que participa en este mecanismo. Este último punto es poco probable debido a que las concentraciones

utilizadas en este trabajo (10  $\mu$ M de GW280264X) están dentro del rango descrito y utilizado anteriormente (Hundhausen et al., 2003; Lizama et al., 2011), lo que sugiere que la primera proposición puede ser más plausible. Prueba de ello es que la fosforilación de la cola citoplasmática de la ADAM17 es realizada, preferentemente por ERK1/2, que a su vez, se activa por receptores de factores de crecimiento, como el EGFR de una forma dependiente de la ADAM17 (Kakiashvili et al., 2011). El grupo de Kakiashvili propone que EGFR es activado por el ligando EGF, que es liberado de la superficie celular por la ADAM17, lo que sugiere que la inhibición de la ADAM17 mediante la aplicación de GW280264X, podría disminuir los niveles de EGF en el líquido extracelular, disminuyendo la activación del eje EGFR-ERK1/2-ADAM17, dando una respuesta posible a los niveles más bajos de la ADAM17 en la superficie celular después de la inhibición de la ADAM17. Estos datos sugieren una auto-regulación de la ADAM17. Esta hipótesis se ve confirmada por el hecho de que la fosforilación de la cola citoplasmática de la ADAM17 es realizada por ERK1/2 en la treonina-735, que es una característica importante en la activación de la ADAM17 y en su tráfico a la superficie celular (Diaz-Rodriguez et al., 2002; Soond et al., 2005), pero también puede ser fosforilada por p38<sup>MAPK</sup> en el mismo residuo, favoreciendo la activación de la ADAM17 (Killock and Ivetic, 2010; Hall and Blobel, 2012). Esto concuerda con algunos de nuestros resultados, ya que los inhibidores de p38<sup>MAPK</sup>, PD169316 y SB202190 disminuyeron la fosforilación de la ADAM17 en treonina 735 (Anexo Fig. 6), sugiriendo que los tratamientos utilizados aumentan la activación de la ADAM17, lo cual queda demostrado por la maduración de la ADAM17 (Fig. 12).

Por otra parte, NP induce muerte celular por apoptosis y translocación de la ADAM17, pero posiblemente por otra vía intracelular, ya que GW280264X sólo redujo la

muerte celular por apoptosis, sin cambiar los niveles superficiales de la ADAM17 en células tratadas con NP. Debido a que GW280264X inhibe la ADAM17 y la ADAM10, podemos descartar la participación de la ADAM10 como una vía alterna del efecto de NP. El efecto diferencial de BPA y NP se confirma, también, porque la maduración de la ADAM17 inducida por BPA pero no de NP, fue reducida solo por GW280264X e inhibidores de p38<sup>MAPK</sup> (Fig. 14).

### **7.3. Análisis del efecto del estrés oxidativo y participación de proteínas quinasas.**

Se sabe que los xenoestrógenos producen, entre otros efectos, estrés oxidativo en el epidídimo de ratas y las células de Sertoli (Chitra et al., 2002; Gong and Han, 2006), lo que es confirmado en el presente estudio (Figs. 18 y 19). Además, se demostró que la aplicación previa de un antioxidante como el AA, previene la muerte celular inducida por BPA o NP (Fig. 20 y Tabla 2), sugiriendo fuertemente la implicancia del estrés oxidativo como una de las principales rutas de inducción de muerte celular. Esta respuesta oxidativa puede, a su vez, conducir a la activación de varias proteínas, incluyendo p38<sup>MAPK</sup>, que responde a varios tipos de estrés celular (Lizama et al., 2009; Chen et al., 2010), y la activación de p38<sup>MAPK</sup>, a su vez, media el aumento de la ADAM17 en la superficie, ya que la inhibición de p38<sup>MAPK</sup> disminuye los niveles superficiales de la ADAM17 en células tratadas con NP (Fig. 14).

La p38<sup>MAPK</sup> está involucrada en la respuesta al estrés inducida por xenoestrógenos en el testículo (Kim et al., 2010; Lee and Lim, 2010; Lizama et al., 2010b). Por lo tanto, estudiamos la posible participación de la p38<sup>MAPK</sup> en la apoptosis inducida por los xenoestrógenos BPA y NP. Observamos que la inhibición de al p38<sup>MAPK</sup> reduce la

apoptosis inducida por BPA o NP (Fig. 17D), sugiriendo que  $p38^{MAPK}$  es otro miembro clave en este proceso. Curiosamente,  $p38^{MAPK}$  disminuye su fosforilación en células TM4 tratadas con NP (Aravindakshan and Cyr, 2005), pero en el sistema utilizado en el presente trabajo (testículo de rata), el NP y el BPA aumentaron la fosforilación de la  $p38^{MAPK}$ , y además aumentaron la incidencia de muerte celular por apoptosis en las células germinales, lo que sugiere que los resultados varían de acuerdo al modelo de estudio. Sin embargo, el presente trabajo se realizó *in vivo*, por lo que presenta mayor relevancia a nivel fisiológico. La apoptosis inducida por BPA o NP fue reducida por la inhibición de la  $p38^{MAPK}$  (Tabla 2), sugiriendo aún más la participación de esta quinasa en la muerte inducida por xenoestrógenos. La participación de  $p38^{MAPK}$  en la apoptosis inducida por el BPA y el NP, sugieren que estos compuestos podrían actuar más bien como una señal de estrés que como moléculas con propiedades similares al estrógeno, ya que la  $p38^{MAPK}$  es un marcador muy conocido de estrés celular (Liu and Chang, 2009; Lizama et al., 2009; Scott et al., 2011).

La inhibición de la  $p38^{MAPK}$  por PD169316 redujo significativamente el aumento de los niveles de la superficie la ADAM17 inducido por BPA o NP (Fig. 14), lo que sugiere que la  $p38^{MAPK}$  juega un papel central y común en el mecanismo de acción de BPA y NP. Curiosamente, el grupo de trabajo de Killock muestra resultados muy similares utilizando un modelo de estudio completamente diferente (monocitos y linfocitos), y describen que se produce una reducción de la ADAM17 superficial (como medida de activación de la ADAM17) y una reducción en la fosforilación de su cola citoplasmática al bloquear la  $p38^{MAPK}$  (Killock and Ivetic, 2010), lo que sugiere la participación directa de esta quinasa en la activación (fosforilación y translocación) de la ADAM17. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la  $p38^{MAPK}$  es un miembro del mecanismo de activación de la ADAM17 desencadenado por los xenoestrógenos, y que la vía activada

por NP podría estar más relacionada con la  $p38^{MAPK}$  que la vía activada por BPA en cuanto a la exposición de la ADAM17 en la superficie, ya que el aumento de la ADAM17 en la superficie celular inducida por BPA fue reducida al inhibir tanto la  $p38^{MAPK}$  como la misma ADAM17, mientras que la inducida por NP sólo fue disminuida con el inhibidor de la  $p38^{MAPK}$  (Fig. 14).

¿El incremento en la ADAM17 en la superficie de la célula es una consecuencia o una causa de la muerte celular por apoptosis? Es más probable que sea una causa más que una consecuencia de la muerte celular por apoptosis, ya que su propiedad de desprender ectodominios de c-kit *in vivo* (Lizama et al., 2010b) y la participación documentada en la apoptosis en *in vitro* con etopósido, un fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer (Lizama et al., 2011), sugieren que la activación de la ADAM17 es anterior a la apoptosis de las células germinales, lo cual fue visto en este trabajo.

#### **7.4. Análisis del efecto del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre la activación de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos**

Debido a que una de las principales respuestas celulares inducidas por los xenoestrógenos es el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , decidimos estudiar si esta vía está relacionada con el aumento de la ADAM17 en la superficie, debido a que en trabajos previos se ha mostrado que la PKC puede ser activada por  $Ca^{2+}$  y que es una quinasa que promueve la activación de la ADAM17 (Killock and Ivetic, 2010; Khadra et al., 2011; Kveiborg et al., 2011). Por otro lado, se ha propuesto que los canales formados por Panx1 pueden movilizar  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplasmático hacia el citoplasma (Vanden Abeele et al., 2006), pudiendo, por lo tanto, movilizar  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular al interior de las células. Además, estos hemicanales están asociados a la liberación de IL-1 $\beta$ , proteína que

recientemente se ha descrito como un activador de la ADAM17 (Pelegriin and Surprenant, 2009; Hall and Blobel, 2012), por lo que Panx1 se convierte en un buen candidato como mediador del efecto de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y activación de la ADAM17 inducida por los xenoestrógenos.

Nuestros resultados demuestran que tanto BPA como NP inducen un aumento de la captación del colorante bromuro de etidio en cultivos primarios de células de Sertoli, captación que es eliminada en presencia de  $\text{La}^{3+}$  (Fig. 22). También, demostramos que los xenoestrógenos utilizados en este trabajo producen un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células de Sertoli en cultivo primario y células germinales aisladas. Sin embargo, este aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no fue eliminado por bloqueadores de hemicanales formados por pannexinas o conexinas, pero sí fue aumentado en el caso de la aplicación de del  $\beta$ -GA, sugiriendo que es probable que los hemicanales sí participen de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  pero de una manera diferente (Figs. 26 y 27), es probable que estos hemicanales puedan participar como una vía de escape a la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, y el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  observado después de la aplicación de  $\beta$ -GA podría corresponder a una acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, esto no podemos comprobarlo con nuestros experimentos, pero constituye una interesante hipótesis a estudiar.

Para corroborar si el  $\text{Ca}^{2+}$  está involucrado en la activación de la ADAM17, utilizamos un sistema *in vitro* de células LnCap transfectadas con un sustrato de la ADAM17, neuregulina- $\beta$ 1, acoplado a fosfatasa alcalina ((AP)-NRG- $\beta$ 1). Nuestros resultados muestran que la ADAM17 puede ser activada por un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediante un ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular mediado por un ionóforo (Fig. 21 A y B) en células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1, pero no de un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de

liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde reservorios intracelulares mediante la inhibición de la SERCA por tapsigarguina (Fig. 21B). Este resultado es muy similar a lo expuesto por el grupo de Camden y cols., donde los receptores P2Y también están relacionados con la activación de la ADAM17 en el corte del precursor de la proteína amiloidea (APP, por sus siglas en inglés) en presencia de UTP extracelular. Esta activación de la ADAM17 es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular pero no del movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula, ya que la aplicación de BAPTA-AM, tapsigarguina o de ionomicina no redujo el corte proteolítico de APP en presencia de UTP, sugiriendo que el mecanismo no incluye cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por los receptores P2Y<sub>2</sub> para activar la ADAM10 y la ADAM17, pero que sí depende del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Camden et al., 2005).

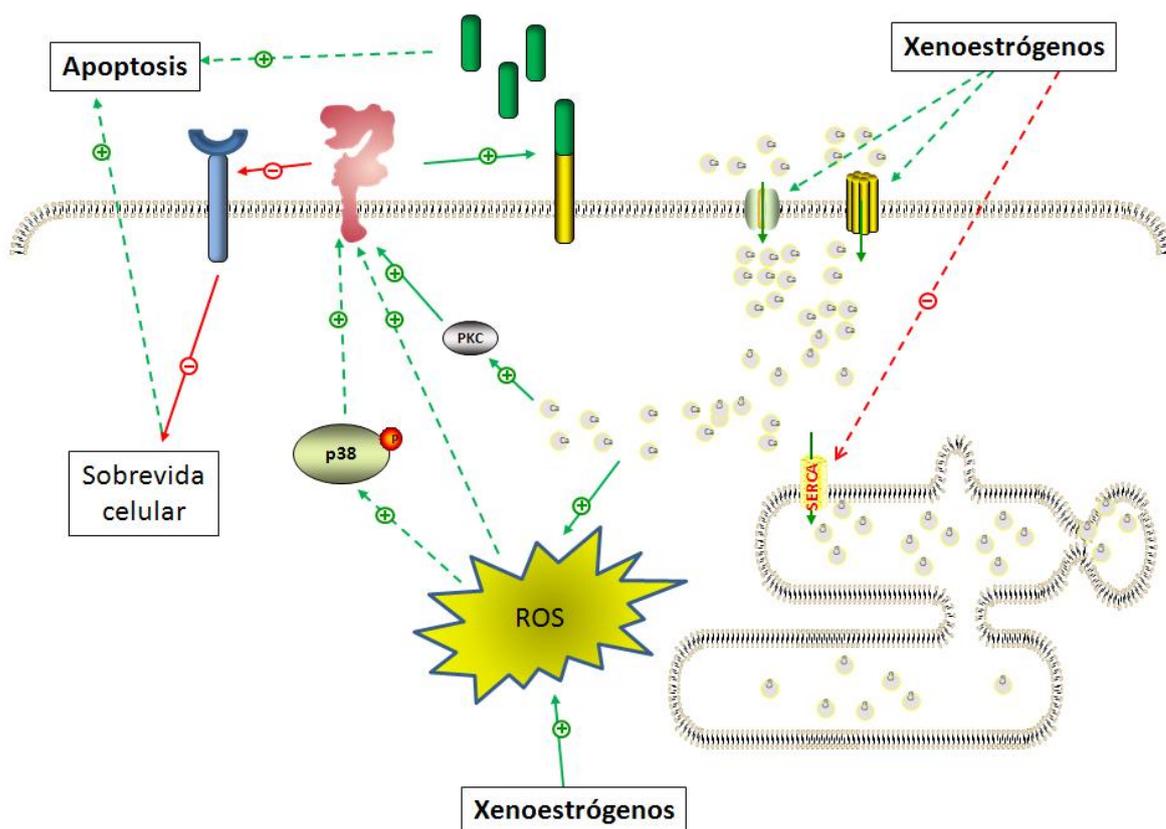
Desafortunadamente, las células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1, no responden a xenoestrógenos con aumentos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como ocurrió en los otros modelos de estudio (Fig. 24). Consistentemente con este resultado, ni CBX ni  $\beta$ -GA previnieron significativamente el aumento de la actividad de la ADAM17 inducido por xenoestrógenos, específicamente NP (Fig. 29). Esto último sugiere fuertemente que la Panx1 (y hemicanales en general) no está ligada a los efectos de xenoestrógenos sobre la actividad de la ADAM17. Sin embargo, en las células germinales que sí responden a xenoestrógenos con un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , no se registró una disminución en los niveles de la ADAM17 en la superficie de estas células utilizando CBX y  $\beta$ -GA (Fig. 29), sugiriendo aún más que hemicanales formados por pannexinas y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no forman parte del mecanismo de acción de xenoestrógenos sobre células LnCap. Más aún, no pudimos detectar la Panx1 en estas células (Anexo Figs. 9 y 10), por lo que se podría descartar la participación de esta proteína en la activación de la ADAM17 en células LnCap, pero no así en células germinales, donde la aplicación de inhibidores de hemicanales sí indujo los

efectos, a pesar de no ser significativos, como en la localización en superficie celular de la ADAM17 (Fig. 29).

Si bien la ADAM17 puede ser activada por ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$ , el efecto de los xenoestrógenos sobre la actividad de la ADAM17 parece ser independiente de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las células LnCap. Aún así, no podemos descartar la participación de los receptores P2Y o P2X en respuesta a xenoestrógenos en otros tipos celulares como las células germinales, ya que se sabe que estos receptores pueden actuar de forma independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y aumentar la actividad de metaloproteasas que favorecen el corte proteolítico de APP en presencia de ATP (Camden et al., 2005; Delarasse et al., 2011). Esta es una posibilidad que debemos explorar, ya sea utilizando inhibidores farmacológicos o siRNA contra los receptores P2Y y P2X para evaluar la acción de xenoestrógenos en la ausencia de estos.

Se ha propuesto que la ADAM17 puede ser activada por ATP en un proceso dependiente de los receptores P2Y<sub>2</sub>, aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la generación de ROSs generados en las mitocondrias (Shao and Nadel, 2005; Myers et al., 2009). Los experimentos del presente trabajo avalan un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células germinales y un aumento de ROSs en testículos de rata, por lo que estudiar la generación de ROSs desde las mitocondrias, a partir del aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , y si esta posible generación de ROSs está relacionada con la activación de las ADAMs en respuesta a los xenoestrógenos o a un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , podría ser de utilidad para determinar el mecanismo involucrado en la respuesta a los xenoestrógenos. La activación de la ADAM17 mediada por ROS se debe a la oxidación de un grupo tiol de una cisteína del prodominio de esta metaloproteasa, que permite la descoordinación de esta cisteína con el átomo de zinc dentro de dominio

metaloproteasa, activando la enzima (Zhang et al., 2001; Shao and Nadel, 2005; Myers et al., 2009), demostrando que esta activación de la ADAM17 puede ser directa. En este sentido, es improbable que la activación de la ADAM17 inducida por xenoestrógenos sea de tipo directo, ya que el tiempo mínimo desde la aplicación de xenoestrógenos hasta que se observa un aumento significativo de la liberación de FA desde células LnCap (AP)-NRG- $\beta$ 1 es de 3 horas, debido a la acumulación de FA en el medio, sin embargo, la activación de la ADAM17 ha sido observada desde los 15 minutos en células LnCap, evaluada por fosforilación en treonina 735 (datos no publicados de Paulina Urriola). Por otro lado, la teoría de un aumento de ROS mediado por un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Myers et al., 2009), es más plausible.



**Figura 31: Modelo de acción de NP y BPA sobre la ADAM17.**

El NP y el BPA generan un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que proviene desde el medio extracelular, por lo que los xenoestrógenos deben activar algún canal. En otros modelos, sin embargo, se ha observado una liberación de  $Ca^{2+}$  desde reservorios intracelulares. El aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  puede, a su vez, activar la quinasa PKC $\delta$ , la que, a su vez, activa la ADAM17. Otra ruta que puede ser activada por el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , es la generación de ROS, la que puede ser activada desde las mitocondrias en un proceso dependiente del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , o bien, directamente mediada por los xenoestrógenos. Es sabido que las ROSs activan a la p38<sup>MAPK</sup>, la cual es un activador de la ADAM17, lo que ya comprobamos en este trabajo. La inhibición de la p38<sup>MAPK</sup> disminuye los niveles de la ADAM17 en la superficie celular, y la muerte de células germinales inducida por los xenoestrógenos, sugiriendo la participación de la p38<sup>MAPK</sup> en este proceso. Las ROSs pueden activar directamente a la ADAM17, aunque este proceso directo de activación parece no estar involucrado en la respuesta a xenoestrógenos. La activación de la ADAM17 podría gatillar un procesamiento proteolítico de receptores de supervivencia, como c-kit, o de un aumento en la liberación de citoquinas pro-apoptóticas. En ambos casos la respuesta final es el aumento de la muerte por apoptosis de células germinales. La p38<sup>MAPK</sup> se presenta como el gran mediador de la respuesta negativa a los xenoestrógenos en células germinales, promoviendo la activación de la proteína ejecutora ADAM17.

En conjunto, estos datos muestran los efectos negativos de una inyección única y de baja concentración de dos conocidos xenoestrógenos, BPA y NP, sobre la fisiología y sobrevivencia celular de células germinales. También proponemos como nuevos participante en este desconocido mecanismo a la  $p38^{MAPK}$  y la ADAM17, como regulador y ejecutor, respectivamente, pudiendo proponer un modelo de acción de los xenoestrógenos en células germinales (Fig. 31). Nuestros resultados comprueban que la ADAM17 puede ser activada por ingreso de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular, demostrado por la adición de un ionóforo de  $Ca^{2+}$  y observando la liberación de substratos de la ADAM17, pero no por liberación de  $Ca^{2+}$  de reservorios intracelulares. Los xenoestrógenos aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$  en células germinales y de Sertoli, a la vez que aumentan la localización de la ADAM17 en la superficie celular. A pesar que este aumento no fue estadísticamente significativo, sí puede ser relevante a nivel fisiológico, por lo que no podemos descartar el  $Ca^{2+}$  como mediador de la activación de la ADAM17. Los xenoestrógenos BPA y NP, afectan a la célula aumentando los niveles de ROS, los cuales, a su vez, podrían incrementar la fosforilación de la  $p38^{MAPK}$ . Es sabido que la producción de ROS puede ser aumentada, a su vez, por un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la cual es inducida por los xenoestrógenos. Por resultados de otros investigadores y los nuestros, sabemos que la  $p38^{MAPK}$  y las ROSs participan en la activación/maduración y translocación de la ADAM17 a la superficie celular, que es el lugar de acción de la ADAM17, por lo que son buenos candidatos como reguladores de la ADAM17 en respuesta a los xenoestrógenos. A pesar que las ROSs parecen activar a la ADAM17 directamente en otros modelos de estudio al oxidar ciertos residuos en el prodominio de esta metaloproteasa (Zhang et al., 2001), esto no fue probado en esta tesis. Sin embargo, como se dijo anteriormente, la fosforilación de ADAM17 aumenta desde los 15 minutos en células LnCap tratadas con xenoestrogenos (datos no publicados de Paulina Urriola), sugiriendo la participación de alguna quinasa en este proceso, lo cual concuerda

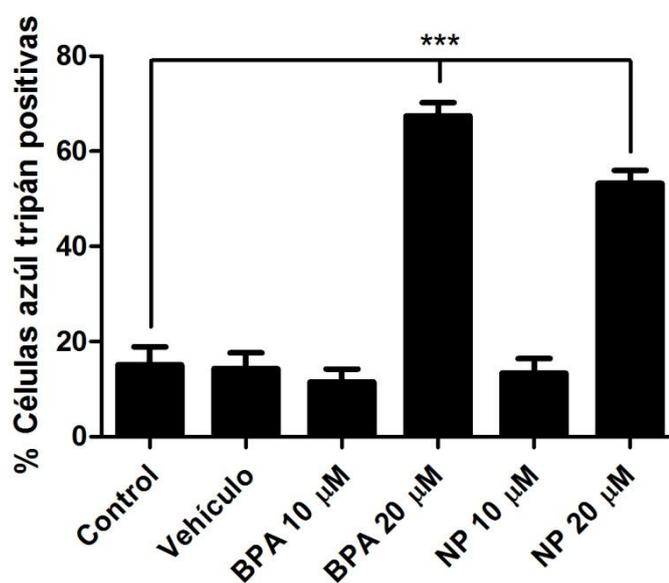
con nuestros datos de activación de p38<sup>MAPK</sup>. Además, observamos que se producen respuestas rápidas a los xenoestrógenos, como aumentos en la  $[Ca^{2+}]_i$  de células germinales aisladas, sugiriendo que este  $Ca^{2+}$  podría estar río arriba de la generación de ROSs y activación de p38<sup>MAPK</sup>. Una vez en la superficie, la ADAM17 puede tener acceso a las moléculas encargadas de la sobrevivencia celular que al ser procesadas proteolíticamente, pueden activar apoptosis, como es el caso del receptor c-kit (Lizama et al., 2010b). Lo mismo podría ocurrir si la ADAM17 activa ciertas citoquinas que promueven muerte celular, aumentando la apoptosis. Es muy probable que este mecanismo ocurra dentro de la propia célula germinal, pero no podemos descartar la participación de la célula de Sertoli como un pivote en la apoptosis de células germinales.

## 8. Anexo Figuras:

A

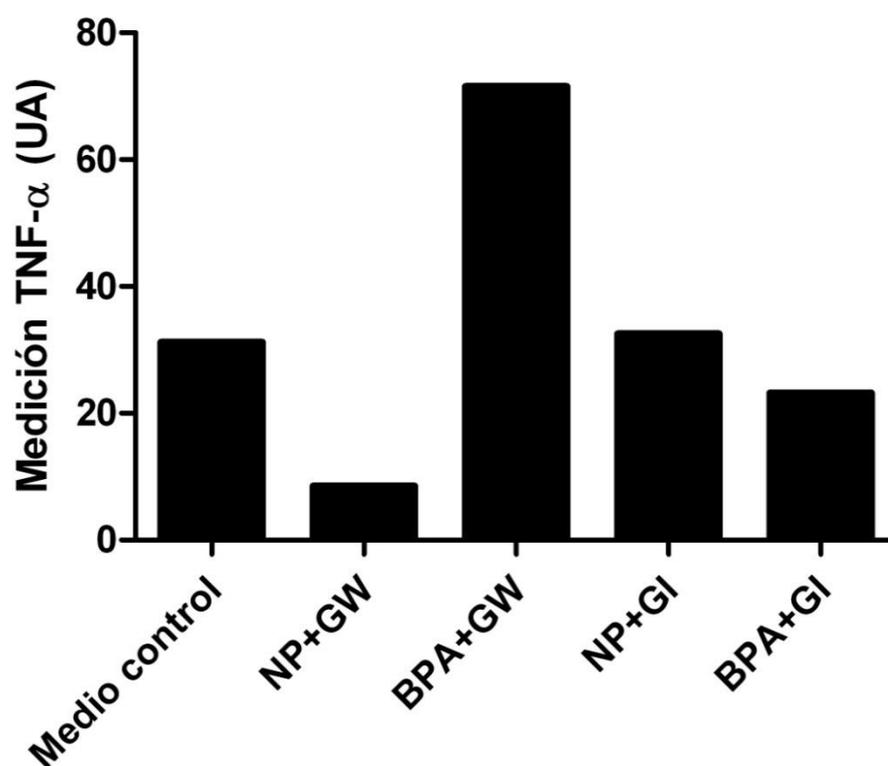


B



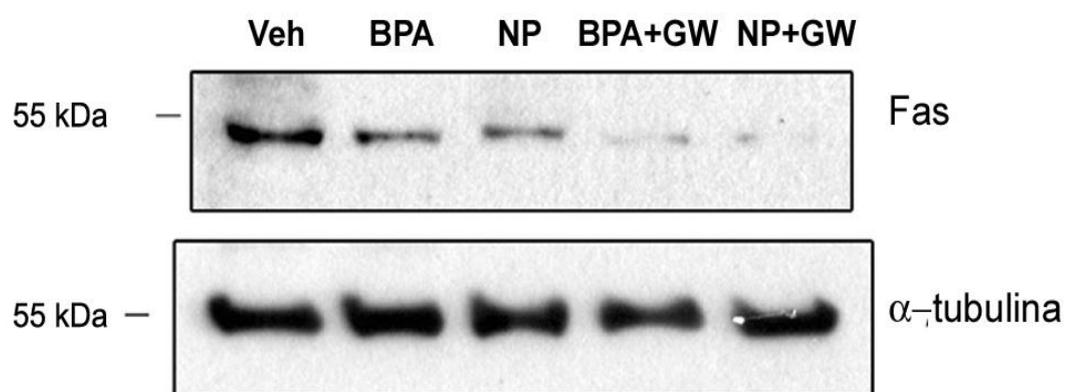
**Anexo Figura 1: Disminución de la viabilidad celular luego de la aplicación de 20  $\mu\text{M}$  de BPA y NP en cultivos primarios de células de Sertoli por 24 horas.**

(A) Fotografía del cultivo de células de Sertoli luego de 24 horas de tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  de BPA o NP. Se observa una desaparición total de células en los paneles de BPA y NP comparados con el control. (B) Cuantificación del porcentaje de células azul tripán positivas en cultivo primario de células de Sertoli tratadas 24 horas con vehículo, 10  $\mu\text{M}$  ó 20  $\mu\text{M}$  de BPA o NP, en donde se observa un aumento del porcentaje de células azul tripán positivas con 20  $\mu\text{M}$  de BPA o NP. En (A) Barra 100  $\mu\text{M}$ . N=3. \*\*\*  $p < 0,05$ . Promedio  $\pm$  SEM.

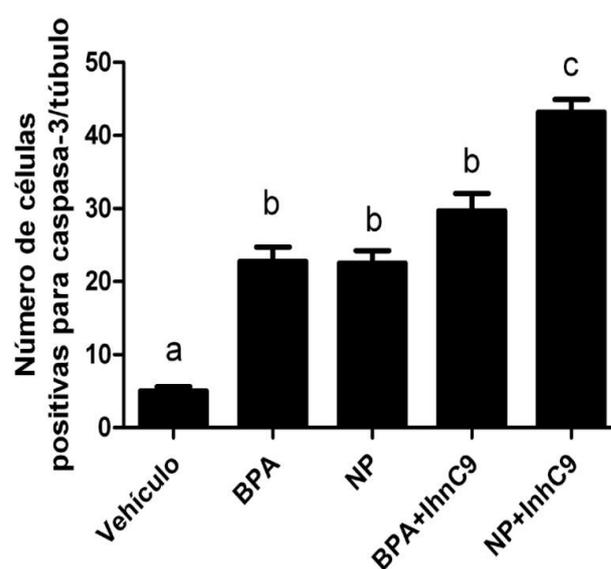
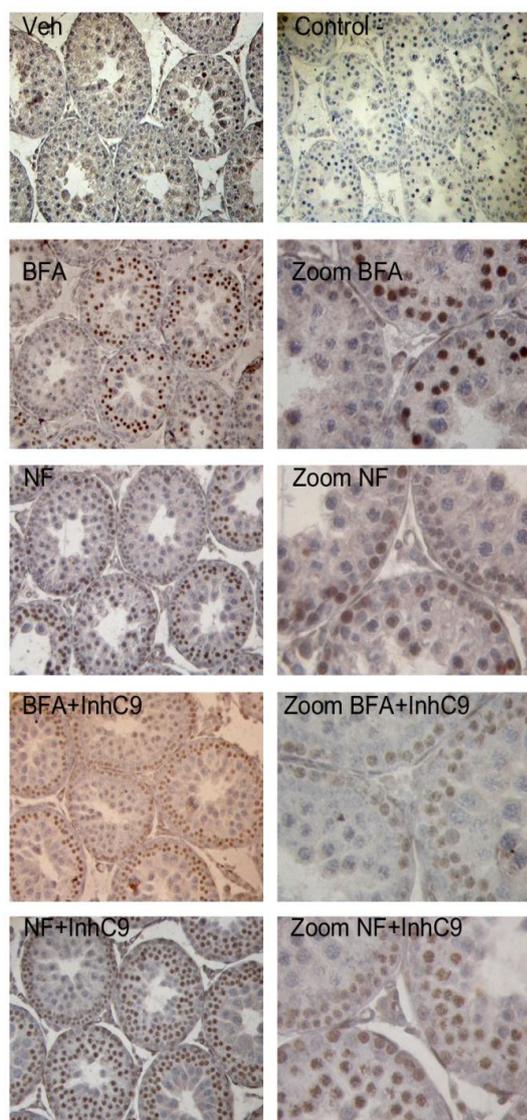


**Anexo Figura 2: Interferencia producida por GW280264X en la medición de TNF- $\alpha$ .**

El medio de cultivo fresco (sin contacto con células), mas la adición de BPA y GW280264X, induce un aumento en la colorimetría del kit de TNF- $\alpha$  usado en esta tesis. La mezcla con NP y GW280264X produce una disminución de la medición, presentándose problemas con estos tratamientos.

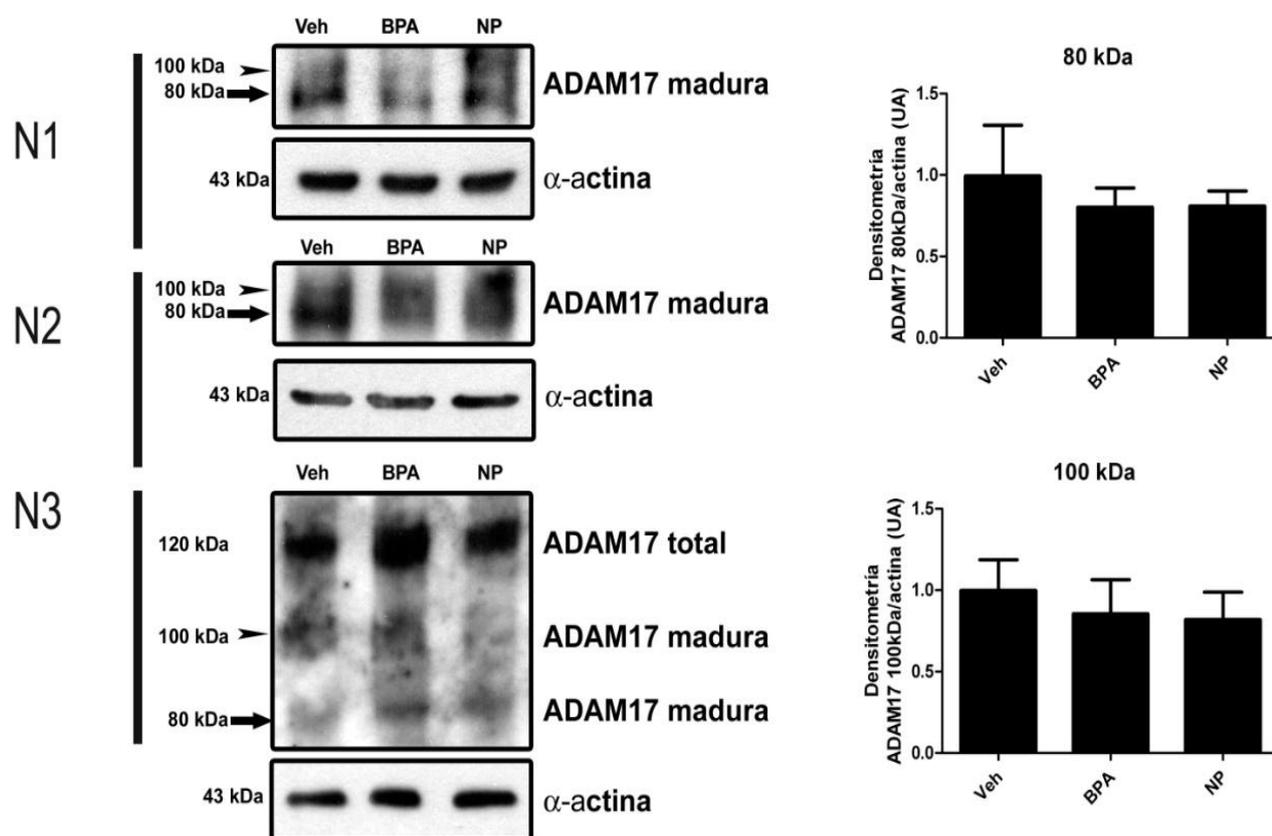


**Anexo Figura 3: Niveles del receptor de FasL, Fas, disminuyen después de la inhibición de la ADAM17 por el inhibidor GW280264X, en conjunto con la estimulación con los xenoestrógenos BPA y NP.**



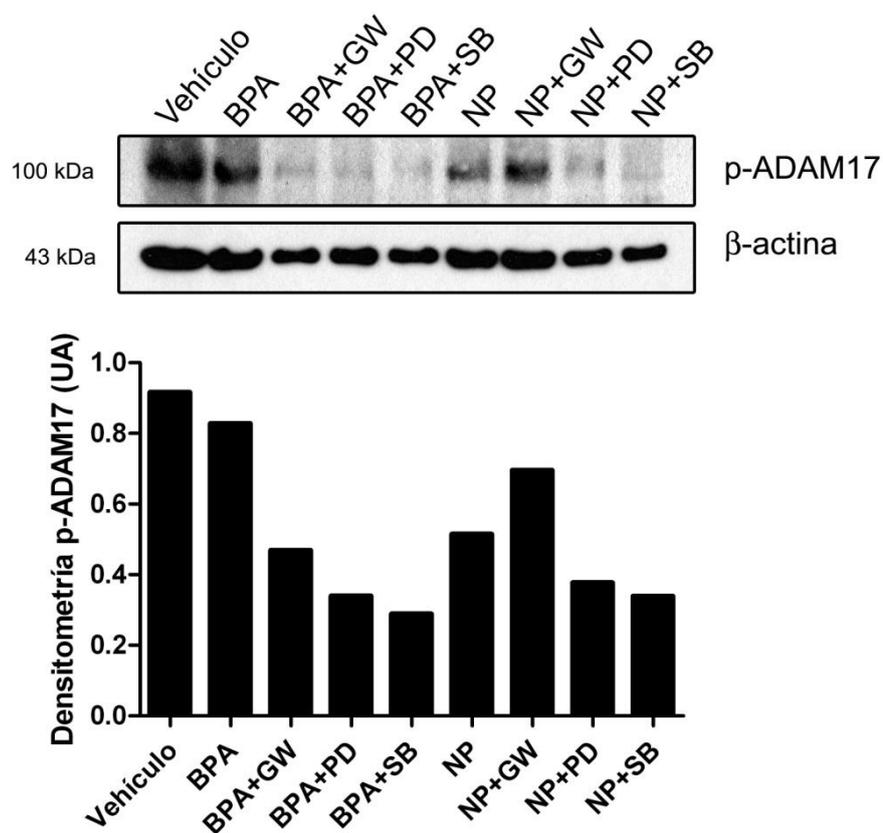
**Anexo Figura 4: Conteo de células positivas para caspasa-3 en presencia de BPA y NP, y del inhibidor de caspasa-9.**

A la izquierda se observan imágenes representativas de la inmunotinción de caspasa-3 activa frente a los distintos tratamientos. En el panel derecho se encuentra la cuantificación del número de células positivas para caspasa-3 activa.

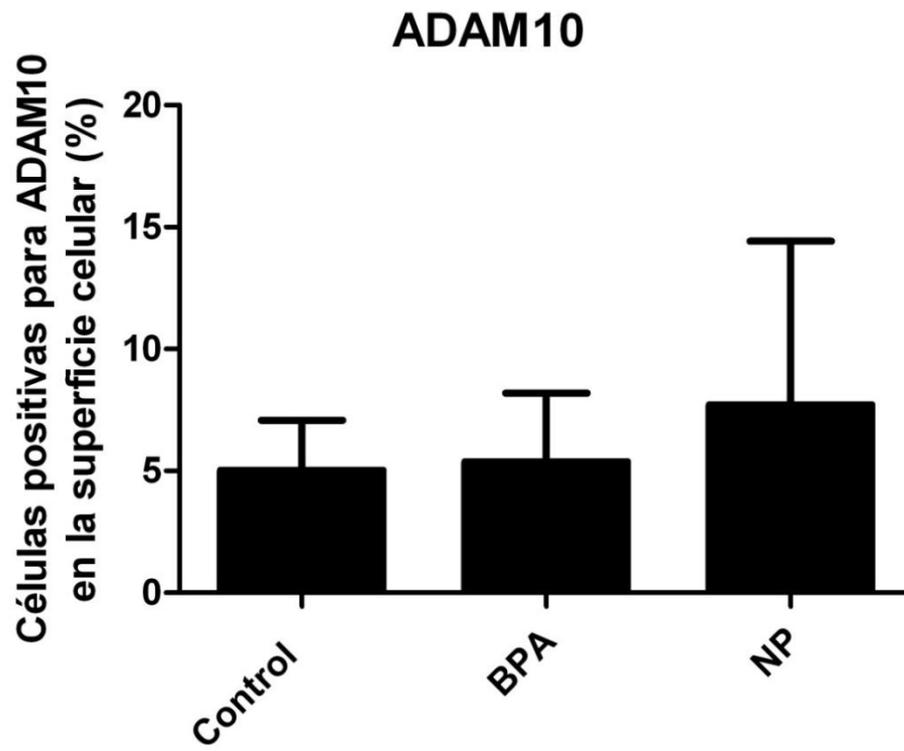


#### Anexo Figura 5: Niveles de ADAM17 madura después de la aplicación de BPA y NP.

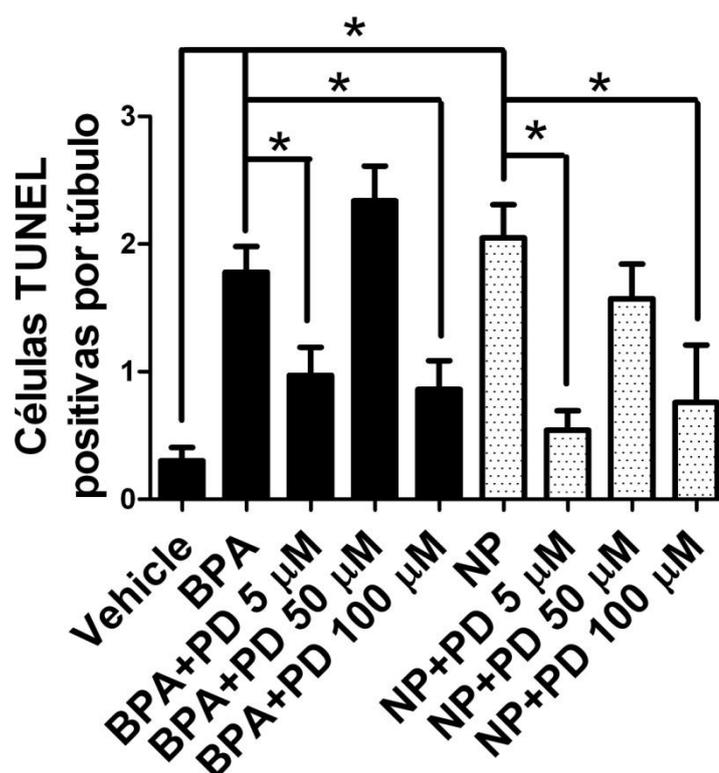
Tres experimentos independientes, utilizando concanavalina como método para purificar aún más la ADAM17, se determinó que los niveles de la forma madura de esta metaloproteasa no cambian luego de la aplicación de BPA o NP en testículo de rata total. En el panel derecho se observa la densitometría de la banda de 80 kDa (arriba) y de 100 kDa (abajo) de ADAM17. No existen diferencias significativas en ninguna de las dos.



**Anexo Figura 6: La fosforilación de ADAM17 es reducida en presencia de inhibidores de p38<sup>MAPK</sup>, demostrando la participación de esta quinasa en la activación de la ADAM17. Al igual que lo visto mediante citometría de flujo, el inhibidor GW280264X sólo redujo la fosforilación de la ADAM17 en presencia de BPA pero no de NP.**

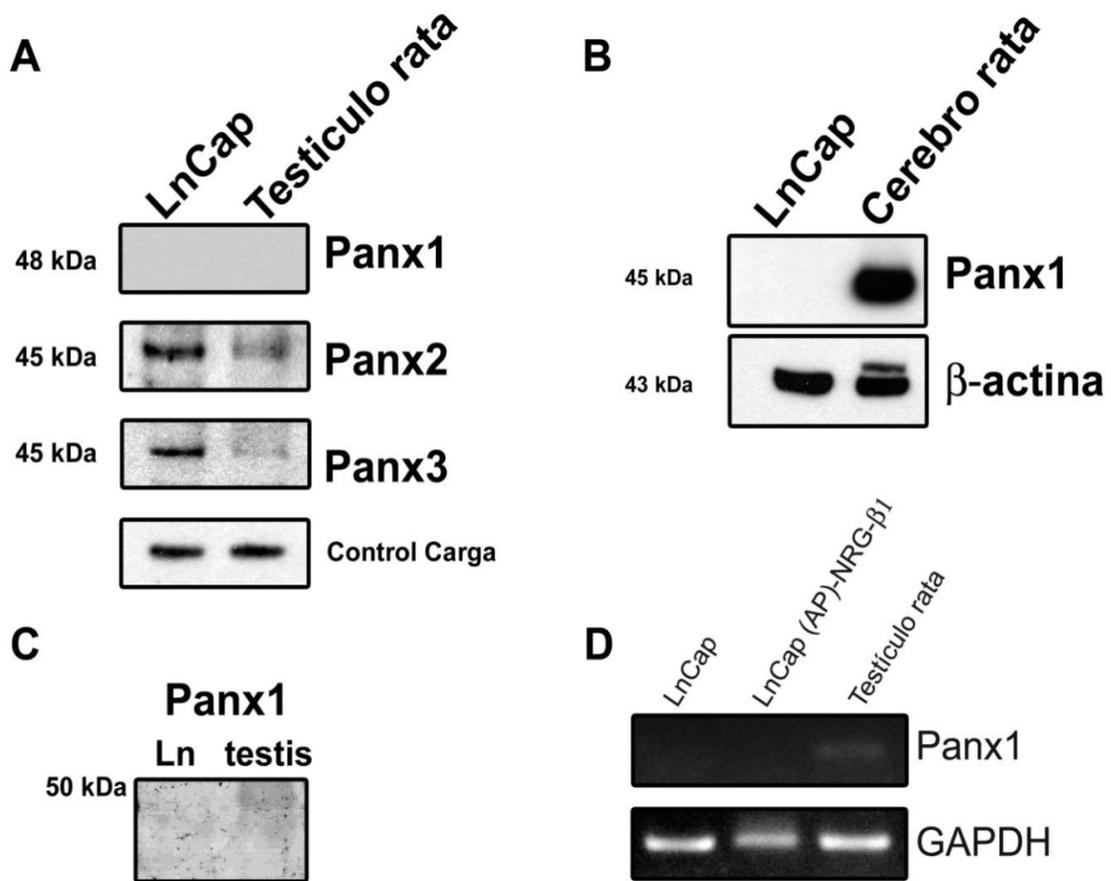


**Anexo Figura 7: Porcentaje de células que portan ADAM10 en su superficie no cambia con los tratamientos de BPA y NP.**  
Posible problema de reconocimiento de anticuerpo.



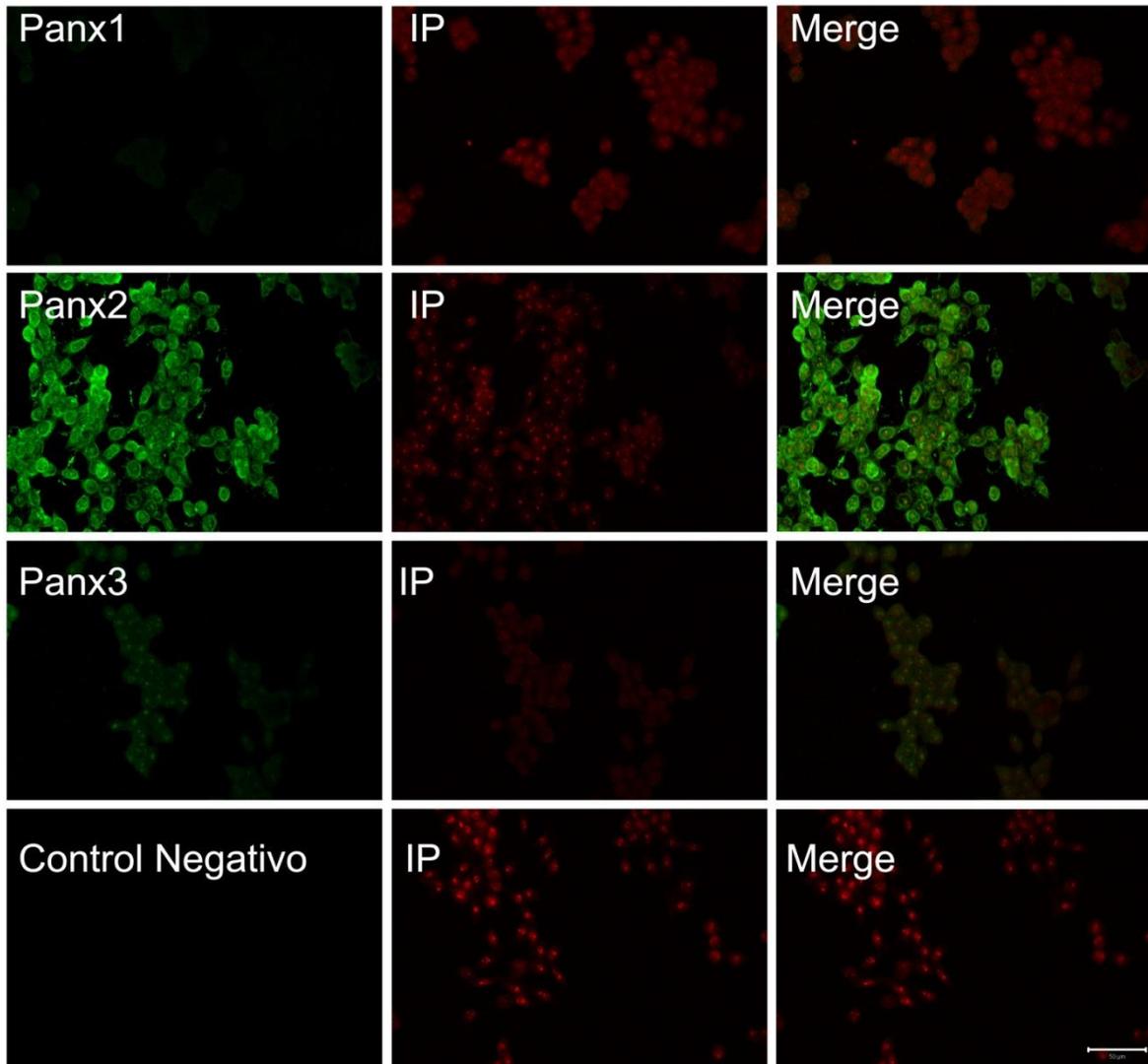
**Anexo Figura 8: Cuantificación de muerte celular en testículos de rata inyectados con distintas concentraciones de p38<sup>MAPK</sup> en presencia de 50 mg/kg de BPA o NP.**

Se observa una disminución significativa de la muerte celular inducida por BPA o NP cuando se aplican 5 μM de PD169316 previamente. La aplicación de 50 μM de PD169316 no reduce el aumento inducido por BPA o NP. La aplicación de 100 μM de PD169316 también redujo significativamente la muerte inducida por BPA o NP. Los asteriscos representan diferencias significativas  $p < 0,05$ . Promedios ± SEM con un N=3.



**Anexo Figura 9: Niveles proteicos y de mRNA de los 3 miembros de las pannexinas.**

A) Localización de Panx1, 2 y 3 en células LnCap y testículo de rata. No se observa banda de Panx1 en LnCap ni en testículo. Esto fue corroborado utilizando otro control positivo (cerebro de rata) en B, detectándose solo en cerebro de rata. En C se observa que el testículo sí posee Panx1 pero en bajos niveles. D) El mRNA de Panx1 se detecta en testículo de rata pero no en células LnCap control o transfectadas con el sustrato de ADAM17.



**Anexo Figura 10: Localización por inmunofluorescencia de Panx1, 2 y 3 en células LnCap por microscopía confocal.**

Panx1 no es detectada por inmunofluorescencia, en cambio Panx2 y 3 presentan una tinción citoplasmática.

## 9. Referencias

- Arama E, Bader M, Srivastava M, Bergmann A, Steller H. 2006. The two *Drosophila* cytochrome C proteins can function in both respiration and caspase activation. *EMBO J* 25:232-243.
- Aravindakshan J, Cyr DG. 2005. Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway. *Biol Reprod* 72:1232-1240.
- Aydogan M, Korkmaz A, Barlas N, Kolankaya D. 2010. Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. *Drug Chem Toxicol* 33:193-203.
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. 1995. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136:5-12.
- 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.
- Camden JM, Schrader AM, Camden RE, Gonzalez FA, Erb L, Seye CI, Weisman GA. 2005. P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* 280:18696-18702.
- Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C. 2012. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Adv Med Sci* 57:31-36.
- Carreau S, Silandre D, Bois C, Bouraima H, Galeraud-Denis I, Delalande C. 2007. Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 45:S5-10.
- Catalano S, Rizza P, Gu G, Barone I, Giordano C, Marsico S, Casaburi I, Middea E, Lanzino M, Pellegrino M, Ando S. 2007. Fas ligand expression in TM4 Sertoli cells is enhanced by estradiol "in situ" production. *J Cell Physiol* 211:448-456.
- Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 8:31.
- Chauvigne F, Menuet A, Lesne L, Chagnon MC, Chevrier C, Regnier JF, Angerer J, Jegou B. 2009. Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect* 117:515-521.
- Chen H, Zhou L, Lin CY, Beattie MC, Liu J, Zirkin BR. 2010. Effect of glutathione redox state on Leydig cell susceptibility to acute oxidative stress. *Mol Cell Endocrinol* 323:147-154.
- Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. 2002. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Arch Toxicol* 76:545-551.
- 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.
- Coureuil M, Ugolin N, Tavernier M, Chevillard S, Barroca V, Fouchet P, Allemand I. 2010. Puma and Trail/Dr5 pathways control radiation-induced apoptosis in distinct populations of testicular progenitors. *PLoS One* 5:e12134.

- Delarasse C, Auger R, Gonnord P, Fontaine B, Kanellopoulos JM. 2011. The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 286:2596-2606.
- 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.
- Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, Williams G, van Gemert M. 1999. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul Toxicol Pharmacol* 29:327-357.
- EC-SCF. 2007. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE (Bisphenol A). *EFSA J*: DOI:10.2903/j.efsa.2007.2428.
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29:258-289.
- Erkekoglu P, Rachidi W, Yuzugullu OG, Giray B, Favier A, Ozturk M, Hincal F. 2010. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol Appl Pharmacol* 248:52-62.
- 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.
- Galichet A, Weibel M, Heizmann CW. 2008. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 370:1-5.
- Gong Y, Han XD. 2006. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reprod Toxicol* 22:623-630.
- Gong Y, Pan X, Huang Y, Gao Z, Yu H, Han X. 2008. NP-induced biophysical and biochemical alterations of rat testicular Sertoli cell membranes related to disturbed intracellular Ca(2+) homeostasis. *Toxicol Lett* 183:10-20.
- Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prast H, Raecker T. 2002. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol* 36:1676-1680.
- Guillette LJ, Jr., Woodward AR, Crain DA, Pickford DB, Rooney AA, Percival HF. 1999. Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes. *Gen Comp Endocrinol* 116:356-372.
- Hall KC, Blobel CP. 2012. Interleukin-1 stimulates ADAM17 through a mechanism independent of its cytoplasmic domain or phosphorylation at threonine 735. *PLoS One* 7:e31600.
- Han SW, Lee H, Han SY, Lim DS, Jung KK, Kwack SJ, Kim KB, Lee BM. 2009. An exposure assessment of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in human semen. *J Toxicol Environ Health A* 72:1463-1469.
- 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.
- Hashimoto S, Bessho H, Hara A, Nakamura M, Iguchi T, Fujita K. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Mar Environ Res* 49:37-53.
- Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. 2010a. 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.
- Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. 2010b. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 5: intercellular junctions and contacts between germ cells and Sertoli cells and their regulatory interactions, testicular cholesterol, and genes/proteins associated with more than one germ cell generation. *Microsc Res Tech* 73:409-494.
- Hou WG, Zhao J, Li Z, Li W, Li T, Xiong LZ, Zhang YQ. 2012. Effects of electromagnetic pulse irradiation on the mouse blood-testicle barrier. *Urology* 80:225 e221-226.
- Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC. 2009. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int* 35:14-20.
- Huesmann GR, Clayton DF. 2006. Dynamic role of postsynaptic caspase-3 and BIRC4 in zebra finch song-response habituation. *Neuron* 52:1061-1072.
- Hughes PJ, McLellan H, Lowes DA, Kahn SZ, Bilmen JG, Tovey SC, Godfrey RE, Michell RH, Kirk CJ, Michelangeli F. 2000. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca(2+) pumps. *Biochem Biophys Res Commun* 277:568-574.
- Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102:1186-1195.
- Hutcheson J, Scatizzi JC, Bickel E, Brown NJ, Bouillet P, Strasser A, Perlman H. 2005. Combined loss of proapoptotic genes Bak or Bax with Bim synergizes to cause defects in hematopoiesis and in thymocyte apoptosis. *J Exp Med* 201:1949-1960.
- 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.
- Kakiashvili E, Dan Q, Vandermeer M, Zhang J, Waheed F, Pham M, Szaszi K. 2011. The epidermal growth factor receptor mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced activation of the ERK/GEF-H1/RhoA pathway in tubular epithelium. *J Biol Chem*.
- Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, Hunter T. 2005. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *J Biol Chem* 280:857-860.
- Kanter M, Topcu-Tarlacalisir Y, Parlar S. 2010. Antiapoptotic effect of L-carnitine on testicular irradiation in rats. *J Mol Histol* 41:121-128.
- Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, Tokuda M, Nakano Y, Inoue M. 2002. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem J* 365:849-856.
- Khadra N, Bresson-Bepoldin L, Penna A, Chaigne-Delalande B, Segui B, Levade T, Vacher AM, Reiffers J, Ducret T, Moreau JF, Cahalan MD, Vacher P, Legembre P. 2011. CD95 triggers Orail-mediated localized Ca<sup>2+</sup> entry, regulates recruitment of protein kinase C (PKC) beta2, and prevents death-inducing signaling complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:19072-19077.
- Killock DJ, Ivetic A. 2010. The cytoplasmic domains of TNF $\alpha$ -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 JY, Han EH, Kim HG, Oh KN, Kim SK, Lee KY, Jeong HG. 2010. Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells. *Toxicol Lett* 193:200-208.
- Kim SK, Yoon YD, Park YS, Seo JT, Kim JH. 2007. Involvement of the Fas-Fas ligand system and active caspase-3 in abnormal apoptosis in human testes with maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Fertil Steril* 87:547-553.
- 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.
- Kveiborg M, Instrell R, Rowlands C, Howell M, Parker PJ. 2011. PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  regulate ADAM17-mediated ectodomain shedding of heparin binding-EGF through separate pathways. *PLoS One* 6:e17168.
- Lagos-Cabre R, Moreno RD. 2012a. Contribution of environmental pollutants to male infertility: A working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biological Research* 45:10.
- Lagos-Cabre R, Moreno RD. 2012b. Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biol Res* 45:5-14.
- Lambrot R, Muczynski V, Lecureuil C, Angenard G, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V. 2009. Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 117:32-37.
- Lee J, Lim KT. 2010. Expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in HMC-1 cells treated with bisphenol A is attenuated by plant-originating glycoprotein (75 kDa) by blocking p38 MAPK. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 382:51-61.
- Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K. 1999. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 140:852-858.
- Lee JH, Wittki S, Brau T, Dreyer FS, Kratzel K, Dindorf J, Johnston IC, Gross S, Kremmer E, Zeidler R, Schlotzer-Schrehardt U, Lichtenheld M, Saksela K, Harrer T, Schuler G, Federico M, Baur AS. 2013. HIV Nef, Paxillin, and Pak1/2 Regulate Activation and Secretion of TACE/ADAM10 Proteases. *Mol Cell* 49:668-679.
- 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, Yao PL, Richburg JH. 2010. FasL Gene-Deficient Mice Display a Limited Disruption in Spermatogenesis and Inhibition of Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate-Induced Germ Cell Apoptosis. *Toxicol Sci* 114:335-345.
- Liu WH, Chang LS. 2009. Arachidonic acid induces Fas and FasL upregulation in human leukemia U937 cells via Ca<sup>2+</sup>/ROS-mediated suppression of ERK/c-Fos pathway and activation of p38 MAPK/ATF-2 pathway. *Toxicol Lett* 191:140-148.
- 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. 2010a. Etoposide induces apoptosis and upregulation of TACE/ADAM17 and ADAM10 in an in vitro male germ cell line model. *Biochim Biophys Acta*: DOI:10.1016/j.bbamcr.2010.1008.1003.
- 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. 2010b. 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.
- Locovei S, Wang J, Dahl G. 2006. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580:239-244.
- 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.
- 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.
- Michelangeli F, Ogunbayo OA, Wootton LL, Lai PF, Al-Mousa F, Harris RM, Waring RH, Kirk CJ. 2008. Endocrine disrupting alkylphenols: structural requirements for their adverse effects on Ca<sup>2+</sup> pumps, Ca<sup>2+</sup> homeostasis & Sertoli TM4 cell viability. *Chem Biol Interact* 176:220-226.
- Milnes MR, Bermudez DS, Bryan TA, Edwards TM, Gunderson MP, Larkin IL, Moore BC, Guillette LJ, Jr. 2006. Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environ Res* 100:3-17.
- Molloy SS, Thomas L, VanSlyke JK, Stenberg PE, Thomas G. 1994. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* 13:18-33.
- Moreno RD, Alvarado CP. 2006. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol Reprod Dev* 73:1430-1434.
- 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. 2011. The emerging role of matrix metalloproteases of the ADAM family in male germ cell apoptosis. *Spermatogenesis* 1:195-208.
- Myers TJ, Brennaman LH, Stevenson M, Higashiyama S, Russell WE, Lee DC, Sunnarborg SW. 2009. Mitochondrial reactive oxygen species mediate GPCR-induced TACE/ADAM17-dependent transforming growth factor- $\alpha$  shedding. *Mol Biol Cell* 20:5236-5249.
- Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B. 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor

- unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11603-11608.
- Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, Tagawa Y, Li C, Taya K, Zhang SY, Naito H, Ramdhan DH, Kamijima M, Nakajima T. 2010. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol Lett* 194:16-25.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22:289-318.
- Oakberg EF. 1956. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 99:391-413.
- Okada A, Kai O. 2008. Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. *Asian J Androl* 10:271-276.
- Orellana JA, Saez PJ, Cortes-Campos C, Elizondo RJ, Shoji KF, Contreras-Duarte S, Figueroa V, Velarde V, Jiang JX, Nualart F, Saez JC, Garcia MA. 2012. Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* 60:53-68.
- 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.
- Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders PT. 2008. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction* 136:73-84.
- Paul C, Teng S, Saunders PT. 2009. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod* 80:913-919.
- Peiretti F, Canault M, Deprez-Beauclair 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.
- Pelegrin P, Surprenant A. 2009. The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1beta release. *Purinergic Signal* 5:129-137.
- Penuela S, Gehi R, Laird DW. 2012. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta*.
- Petersen C, Soder O. 2006. The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 66:153-161.
- Phillips KP, Tanphaichitr N. 2008. Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11:188-220.
- Pino JA, Osses N, Oyarzun D, Farias JG, Moreno RD, Reyes JG. 2013. Differential effects of temperature on reactive oxygen/nitrogen species production in rat pachytene spermatocytes and round spermatids. *Reproduction* 145:203-212.
- Quesada I, Fuentes E, Viso-Leon MC, Soria B, Ripoll C, Nadal A. 2002. Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J* 16:1671-1673.
- 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.
- Reyes JG, Farias JG, Henriquez-Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, Zepeda AB, Moreno RD. 2012. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev* 2012:929285.

- Richburg JH, Boekelheide K. 1996. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 137:42-50.
- Richburg JH, Nanez A, Williams LR, Embree ME, Boekelheide K. 2000. Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. *Endocrinology* 141:787-793.
- Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. 2009. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit* 15:RA137-145.
- Ruwanpura S, McLachlan R, Meachem S. 2010. Hormonal regulation of germ cell development. *J Endocrinol* 205:117-131.
- 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.
- Schindler CK, Pearson EG, Bonner HP, So NK, Simon RP, Prehn JH, Henshall DC. 2006. Caspase-3 cleavage and nuclear localization of caspase-activated DNase in human temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:583-589.
- Schlondorff J, Becherer JD, Blobel CP. 2000. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* 347 Pt 1:131-138.
- Schlondorff J, Blobel CP. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 112:3603-3617.
- Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, Reiss K. 2008. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* 102:1192-1201.
- Scott AJ, O'Dea KP, O'Callaghan D, Williams L, Dokpesi JO, Tatton L, Handy JM, Hogg PJ, Takata M. 2011. Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase mediate tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) activation in primary human monocytes. *J Biol Chem* 286:35466-35476.
- Shao MX, Nadel JA. 2005. Dual oxidase 1-dependent MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:767-772.
- 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.
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:323-330.
- 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.
- Soldani C, Scovassi AI. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 7:321-328.
- Soond SM, Everson B, Riches DW, Murphy G. 2005. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* 118:2371-2380.
- Stoker C, Rey F, Rodriguez H, Ramos JG, Sirosky P, Larriera A, Luque EH, Munoz-de-Toro M. 2003. Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol* 133:287-296.

- 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.
- Takao T, Nanamiya W, Nagano I, Asaba K, Kawabata K, Hashimoto K. 1999. Exposure with the environmental estrogen bisphenol A disrupts the male reproductive tract in young mice. *Life Sci* 65:2351-2357.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-241.
- 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 ERalpha and ERbeta reporter gene cell lines. *J Agric Food Chem* 54:4407-4416.
- 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.
- Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, Ivanov DV, Skryma R, Prevarskaya N. 2006. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J Cell Biol* 174:535-546.
- Vergara SP, Lizama C, Brouwer-Visser J, Moreno RD. 2011. Expression of BCL-2 family genes in germ cells undergoing apoptosis during the first wave of spermatogenesis in the rat. *Andrologia* 43:242-247.
- Wang H, Xiong W, Chen Y, Ma Q, Ma J, Ge Y, Han D. 2006. Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells in vitro through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining. *Reproduction* 132:485-492.
- Wang XW, Ding GR, Shi CH, Zhao T, Zhang J, Zeng LH, Guo GZ. 2008. Effect of electromagnetic pulse exposure on permeability of blood-testicle barrier in mice. *Biomed Environ Sci* 21:218-221.
- Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Alyea RA. 2007. Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids* 72:124-134.
- Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Finnerty CC. 2005. Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids* 70:364-371.
- White JM. 2003. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 15:598-606.
- Wong CH, Xia W, Lee NP, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2005. Regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the seminiferous epithelium by focal adhesion-associated proteins in testosterone-suppressed rat testes. *Endocrinology* 146:1192-1204.
- 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.
- Zhang Y, Lin L, Cao Y, Chen B, Zheng L, Ge RS. 2009. Phthalate levels and low birth weight: a nested case-control study of Chinese newborns. *J Pediatr* 155:500-504.

- Zhang Z, Oliver P, Lancaster JR, Jr., Schwarzenberger PO, Joshi MS, Cork J, Kolls JK. 2001. Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *FASEB J* 15:303-305.
- Zheng Y, Schlondorff J, Blobel CP. 2002. Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *J Biol Chem* 277:42463-42470.

