



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

TESIS DOCTORAL:

LA EXPOSICIÓN AGUDA Y CRÓNICA A FTALATOS Y ALQUILFENOLES O A UNA MEZCLA DE ELLOS, PERTURBA PROCESOS IMPLICADOS EN LA FECUNDACIÓN Y MODIFICA EL PERFIL, CONTENIDO DE RNA, LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA AROMATASA (*Cyp19a1*) Y DEL RECEPTOR NUCLEAR DE ESTRÓGENO *Erb*, VÍA LA DESREGULACIÓN DE microRNAs QUE LOS MODULAN, EN ESPERMATOZOIDES DE RATÓN.

Por

LUZ MARÍA GALLARDO HORMAZÁBAL

Marzo 2022



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

LA EXPOSICIÓN AGUDA Y CRÓNICA A FTALATOS Y ALQUILFENOLES O A UNA MEZCLA DE ELLOS, PERTURBA PROCESOS IMPLICADOS EN LA FECUNDACIÓN Y MODIFICA EL PERFIL, CONTENIDO DE RNA, LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA AROMATASA (*Cyp19a1*) Y DEL RECEPTOR NUCLEAR DE ESTRÓGENO *Erb*, VÍA LA DESREGULACIÓN DE *microRNAs* QUE LOS MODULAN, EN ESPERMATOZOIDES DE RATÓN.

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

Por

LUZ MARÍA GALLARDO HORMAZÁBAL

Director de Tesis: Dr. Ricardo Moreno M.

Comisión: Dr. Manuel Villalón

Dr. Nelson Barrera

Dr. Alexis Parada

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres quienes siempre me inculcaron el amor por el conocimiento, el estudio y la lectura, sin su estímulo desde mi niñez, no tendría las competencias que me permitieron asumir el desafío de ingresar a este programa de doctorado.

También agradezco a la Pontificia Universidad Católica, mi alma mater, que me recibió bajo su alero cuando era prácticamente una adolescente, en un período crítico de la historia de Chile y en la cual, a pesar de esa dura realidad, pasé los mejores momentos de mi vida juvenil, además de adquirir las competencias profesionales que me permitieron desarrollarme exitosamente durante muchos años. Seguí ligada a la PUC durante toda mi vida profesional recibiendo indirectamente la influencia de grandes personas que forman parte de su grupo de profesionales de la salud. Tan sólida fue la formación que se me entregó que a pesar de que, en rigor, no poseía una formación científica, pude insertarme en un programa de Doctorado y en un medio tan diferente al que estaba habituada y pude superar los constantes desafíos de todo tipo, incluso personales que eso significó. Estoy feliz de observar, como mi universidad ha sido capaz de adaptarse a los cambios y de leer las necesidades de la juventud actual.

Pero, sobre todo, agradezco al profesor Ricardo Moreno, por su paciencia infinita, su sentido del humor, su apertura de mente, su capacidad para tomar riesgos y su vocación por la docencia. También un inmenso agradecimiento a todos los geniales miembros del laboratorio del Dr. Moreno y del 5° piso de endocrinología, quienes me ayudaron desinteresadamente durante todos estos años y con quienes viví muy hermosos momentos como siempre ha sido en la PUC.

Finalmente agradezco a mis hijos por su amor incondicional y a mi actual compañero de vida que me hizo volver a recordar quien soy y lo que me interesa y amo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	11
1. RESUMEN	12
2. ABSTRACT.....	14
3. DEFINICIÓN Y ABREVIATURAS	16
4. INTRODUCCIÓN	18
4.1. La singularidad biológica del espermatozoide y de los procesos que lo habilitan para fecundar.	20
4.2. El paradigma del espermatozoide y su RNA.....	26
4.3. El rol de estradiol en la reproducción masculina, la función testicular y en el espermatozoide.	28
4.4. Efecto de los DEs sobre la reproducción y el espermatozoide.....	33
4.5. Los microRNAs como mecanismo de regulación de la espermatogénesis y de la maduración del espermatozoide.	39
4.6. Desregulación de microRNAs implicados en la esteroidogénesis mediada por DEs.	42
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44

6.	HIPÓTESIS	46
6.1.	Hipótesis N°1: “La exposición aguda a NP y DEHP a espermatozoides de ratón afecta su capacidad fecundante”	46
6.2.	Objetivo General N°1.....	46
6.3.	Objetivos Específicos del Objetivo General N°1.....	46
6.4.	Hipótesis N°2: “La exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquilfenoles ..	46
6.5.	Objetivo General N°2.....	47
6.6.	Objetivos Específicos del Objetivo General N°2.....	47
7.	DISEÑO EXPERIMENTAL OBJETIVOS GENERALES N°1 Y N°2.....	48
7.1.	Diseño Experimental Objetivo General N°1 (Modelo de exposición aguda con espermatozoides de ratón “in vitro”).....	48
7.2.	Diseño experimental por cada objetivo específico.....	49
8.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
8.1.	Animales.....	51
8.2.	Capacitación espermática “in vitro”.....	51
8.3.	Evaluación de la Reacción Acrosómica por tinción con azul brillante de Coomassie (CBB).	52
8.4.	Evaluación la Reacción Acrosómica usando LysoTrackerTM.....	53
8.5.	Evaluación de la Reacción Acrosómica mediante citometría de flujo.....	53
8.6.	Extracción de proteínas del espermatozoide.....	54
8.7.	<i>Western Blot</i>	54
9.	DISEÑO EXPERIMENTAL OBJETIVO GENERAL N°2 (Modelo de exposición crónica murina “in vivo”).....	56

9.1. Diseño experimental por cada objetivo específico.....	59
10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
10.1. Animales.....	63
10.2. Niveles plasmáticos de E ₂ y Testosterona.....	69
10.3. Medio de extracción “in vitro” de espermatozoide de ratón.....	70
10.4. Obtención y preparación de los espermatozoides de ratón.....	70
10.5. Evaluación de la Reacción Acrosómica por tinción con azul brillante de Coomassie (CBB).....	71
10.6. Fecundación “in vitro”.....	72
10.7. Determinación de los niveles proteicos de CYP19A1 y ERβ en espermatozoides. 72	
10.8. Extracción de RNA y reacción de amplificación por qPCR y PCR para determinar niveles de Cyp19a1, Erβ y Pre-miRNAs en espermatozoides.....	73
10.9. Metodología para la determinación de miRNAs y Pre-miRNAs a estudiar.....	74
10.10. Extracción de RNA de espermatozoides y Secuenciación Masiva.....	75
10.11. Análisis estadístico.....	76
11. RESULTADOS	77
11.1. Determinar si NP y DEHP inducen la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón. 77	
11.2. Evaluar si NP modula la capacitación alterando la fosforilación de sustratos en Ser/Thr, fosforilación de sustratos en Tyr y la activación de PKA.....	81
11.3. Resultados Objetivo General N°2 (Modelo de exposición crónica murina “in vivo”).	85

12. DISCUSIÓN	106
12.1. Efecto agudo de Nonilfenol y DEHP como inductor de la RA y modulador de la capacitación del espermatozoide de ratón.	106
12.2. Efecto disruptor crónico de una mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles.	110
12.3. Efecto disruptor crónico de una mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles en la capacidad de fecundar de los espermatozoides.	113
12.4. Efecto disruptor crónico de una mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles en la cantidad, perfil y contenido de RNA de los espermatozoides.	116
12.5. Efecto disruptor crónico de una mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles sobre la expresión de Cyp19a1 y Erβ en espermatozoides.	121
13. CONCLUSIONES	123
14. PROYECCIONES	125
15. ANEXO	126
15.1. Experimentos Suplementarios.	126
15.2. Materiales y Métodos de los resultados suplementarios.....	128
15.3. Determinación de los niveles proteicos de CYP19A1 y ERβ en la línea GC-2. 128	
16. REFERENCIAS.....	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la morfología de espermatozoide de ratón.	21
Figura 2. Los eventos tempranos y tardíos de la capacitación del espermatozoide.	23
Figura 3. Representación esquemática de acrosoma y la progresión de la RA en ratón.	24
Figura 4. La esteroidogénesis en el testículo.	31
Figura 5. Estructura química de Ftalatos (DEHP, DBP, BBP) y de Alquilfenoles (NP, OP).	36
Figura 6. Biogénesis canónica y no canónica de los miRNAs.	40
Figura 7. Esquema planteamiento del problema.	45
Figura 8. Esquema del diseño experimental para el objetivo general N°1.	48
Figura 9. Esquema de la administración crónica de Ftalatos y Alquilfenoles al modelo murino.	57
Figura 10. Diseño experimental del modelo de exposición crónica murina.	58
Figura 11. NP y DEHP inducen la RA en espermatozoides de ratón, en concentraciones fisiológicamente relevantes.	79
Figura 12. NP induce la RA en espermatozoides de ratón en condiciones capacitantes y no capacitantes.	80
Figura 13. NP induce la fosforilación de sustratos de PKA en condiciones capacitantes y no capacitantes.	82

- Figura 14.** NP en concentraciones fisiológicamente relevantes, aumenta los niveles de PKA fosforilada (Thr-197) en espermatozoides de ratón. 84
- Figura 15.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles incrementa el peso corporal de los ratones expuestos. 86
- Figura 16.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles actúa como disruptor endocrino alterando el balance testosterona/estradiol en ratones expuestos..... 87
- Figura 17.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles actúa como disruptor endocrino disminuyendo la capacidad de fecundar de los espermatozoides de ratones expuestos. 89
- Figura 18.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles modifica la concentración, contenido total y perfil electroforético del RNA de los espermatozoides de ratones expuestos. 92
- Figura 19.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles indujo una expresión diferencial global de genes en los espermatozoides de ratones expuestos..... 95
- Figura 20.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles modificó el perfil característico de los RNA contenidos en espermatozoides de ratón. 97
- Figura 21.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles indujo una sobre y subexpresión de genes en el RNA de espermatozoides de ratones expuestos. 98
- Figura 22.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles desregula procesos celulares, de modulación fisiológica y del desarrollo..... 99
- Figura 23.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles modificó la expresión de miRNAs y los genes que tienen como blanco, en espermatozoides de ratones expuestos. 102

- Figura 24.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles en una dosis de 1mg/kg/d aumenta los niveles proteicos y de transcritos de Cyp19a1 y Erβ en los espermatozoides de ratones expuestos. 104
- Figura 25.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles disminuye los niveles relativos de Pre-miRNAs que tienen como blanco los transcritos de Cyp19a1 y Erβ en los espermatozoides de ratones expuestos. 105
- Figura 26.** Esquema de conclusiones de los efectos agudos y crónicos de la mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles en el espermatozoide de ratón. 124
- Figura 27.** Esquema del diseño experimental de exposición crónica en un modelo con células germinales “in vitro”. 127
- Figura 28** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles aumenta los niveles proteicos de Cyp19a1 y Erβ y los niveles relativos de sus transcritos en las células GC-2 tratadas. 131
- Figura 29.** La mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles disminuye los niveles relativos de Pre-miRNAs que tienen como blanco los transcritos de Cyp19a1 y Erβ en células GC-2. 133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción de tratamientos con ftalatos y alquilfenoles. Se indica la dosis LOAEL para cada uno de ellos.....	58
Tabla 2. Principales sales y reactivos empleados en este objetivo.	64
Tabla 3. Principales soluciones usadas en este objetivo.	65
Tabla 4. Principales sistemas operativos y programas usados durante esta tesis doctoral.	66
Tabla 5. Principales bases de datos y herramientas web, usadas en este objetivo.....	67
Tabla 6. Descripción, secuencia y eficiencia (E) de las parejas de cebadores empleados en este objetivo.	68
Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en este objetivo.	68
A) Tabla 8. Principales miRNA sobre o sub expresados en espermatozoides de ratones expuestos.	101
Tabla 9. Descripción de las dos dosis de tratamientos con la mezcla de ftalatos y alquilfenoles a las GC-2.	127

1. RESUMEN

La investigación actual evidencia la importancia y función del RNA contenido en los espermatozoides, considerando que la fecundación requiere un espermatozoide funcionalmente activo y cualquier alteración durante la espermatogénesis en el testículo, su maduración en el epidídimo o capacitación en el tracto genital de la hembra puede interferir en la fertilidad del varón. En relación a ello, la espermatogénesis y la maduración del espermatozoide se encuentran regulados a nivel génico y hormonal.

Los microRNAs (miRNAs) son cadenas cortas de RNA no codificante muy abundantes en el testículo y en los espermatozoides, y que tienen como función modular diferentes procesos como diferenciación, morfogénesis y señalización. Por ello, los disruptores endocrinos que interfirieren en la acción de hormonas esteroidales y desregulan miRNAs, pueden alterar estos eventos y modificar el contenido de RNA del espermatozoide, afectando su funcionalidad durante la fecundación o la embriogénesis. Al respecto, evidencia reciente muestra desregulación de miRNAs que están implicados en la función de estradiol y en la modulación de la espermatogénesis, en el semen y en espermatozoides de hombres con infertilidad, sugiriendo una relación entre la desregulación de miRNAs y esta patología.

Los disruptores endocrinos más comúnmente presentes en el ambiente y en fluidos humanos son los ftalatos y alquilfenoles. El efecto de estos compuestos en procesos reproductivos es controversial, principalmente porque en los estudios no se considera que los seres humanos estamos expuestos a mezclas de disruptores desde la embriogénesis y porque no se considera el resultado adverso sobre el producto final de los procesos biológicos, que en la fertilidad masculina, es el espermatozoide. Finalmente, otros ensayos indican que nonilfenol (NP), un alquilfenol, DEHP y otros ftalatos, afectan un evento primordial para la fecundación, como es la reacción acrosómica (RA) en espermatozoides de ratón. Por tanto, los ftalatos y alquilfenoles podrían afectar en forma aguda o crónica la capacidad de fecundar del espermatozoide.

Por ello nos planteamos las siguientes hipótesis:

“La exposición aguda a NP y DEHP a espermatozoides de ratón afecta su capacidad fecundante”.

“La exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquilfenoles modifica la capacidad de fecundación, el perfil de RNA y los niveles de expresión de la enzima aromatasas (*Cyp19a1*) y del receptor nuclear de estrógeno *Erβ*, vía la desregulación de los miRNAs que los modulan, en espermatozoides de ratón”.

En nuestra investigación, observamos el efecto crónico de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles, tratando ratones desde la concepción hasta la adultez. En los espermatozoides de estos ratones estudiamos su funcionalidad, los cambios en el contenido de RNA, los niveles de expresión de la principal enzima implicada en la producción de estradiol y su señalización, y de los miRNAs que los tienen como blanco. Por otro lado, evaluamos el efecto agudo de estos tóxicos con un modelo “*in vitro*”, espermatozoides de ratón expuestos a NP y también a DEHP en los que determinamos su efecto sobre la RA y la capacitación. Para ambos objetivos, usamos tres técnicas de evaluación de la RA, fecundación “*in vitro*”, *Western Blot*, PCR, qPCR y RNAseq.

Nuestros resultados mostraron que los dos tóxicos ambientales utilizados en este estudio (NP y DEHP) y probablemente otros que aún no se han probado, inducen la RA y activan vías de señalización que implican a PKA, la principal quinasa que modula la capacitación de espermatozoide y por tanto, podrían afectar la fertilidad “*in vivo*” al cambiar el momento o el sitio anatómico de la RA y de la capacitación. En cuanto a la exposición crónica a la mezcla nuestros resultados señalan que tiene un efecto obesogénico inicial e inducen una disminución en los niveles de testosterona plasmática y desbalance de la razón Testosterona /Estradiol. Por otro lado, en cuanto al espermatozoide, mostramos por primera vez que en espermatozoides de ratones expuestos crónicamente a dosis bajas de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles, desde una etapa embrionaria temprana hasta la edad adulta, hay importantes alteraciones en el RNA y particularmente una desregulación de la expresión de miRNAs tan relevantes en muchos tipos celulares, como lo es la familia 34/449. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que la mezcla de ftalatos y alquilfenoles altera la histología, disminuye la expresión de aromatasas (*Cyp19a1*), afecta el balance testosterona / estradiol y desregula los niveles de miRNAs que tienen como blanco genes relevantes para la espermatogénesis y ovogénesis en el testículo y ovario de ratones expuestos. En conclusión, la exposición aguda de espermatozoides de ratón a ftalatos y alquilfenoles, la exposición crónica de ratones a una mezcla de estos mismos compuestos en una dosis similar a las estimaciones que estamos expuestos los humanos, afecta la RA, la capacitación, produce alteraciones hormonales y génicas, que podrían tener impacto en la fertilidad masculina.

2. ABSTRACT

Current research shows the importance and function of the RNA contained in sperm, considering that fertilization requires a functionally active sperm and any alteration during spermatogenesis in the testis, its maturation in the epididymis or training in the female genital tract can interfere with male fertility. In relation to this, spermatogenesis and sperm maturation are regulated at the gene and hormonal level.

It is postulated that miRNAs, which are short chains of non-coding RNA highly present in the testis and sperm, modulate the processes that generate functional sperm. Therefore, endocrine disruptors that interfere with the action of steroidal hormones and deregulate miRNAs, can alter these events and modify the RNA content of the sperm, affecting its functionality during fertilization or embryogenesis. In this regard, recent evidence shows dysregulation of miRNAs that are involved in the function of estradiol and in the modulation of spermatogenesis, in the testicle, in semen and in spermatozoa of men with infertility, suggesting a relationship between the dysregulation of miRNAs and this pathology.

The endocrine disruptors most commonly present in the environment and in human fluids are phthalates and alkylphenols. The effect of these compounds on reproductive processes is controversial, mainly because studies do not consider that humans are exposed to mixtures of disruptors from embryogenesis and because the adverse result on the end product of biological processes is not considered, which in male fertility, it is the sperm. Finally, other trials indicate that nonylphenol, an alkylphenol, DEHP, and other phthalates affect a primary event for fertilization, the acrosome reaction (AR) in mouse sperm. Therefore, phthalates and alkylphenols can acutely or chronically affect the sperm ability to fertilize.

For this reason, we propose the following hypotheses:

"Acute exposure to NP and DEHP to mouse sperm affects their fertilizing capacity".

“Chronic exposure to a mixture of phthalates and alkylphenols modifies the fertilization capacity, the RNA profile and the expression levels of the aromatase enzyme (*Cyp19a1*) and the nuclear estrogen receptor *Erβ*, via the dysregulation of the miRNAs that modulate them, in mouse sperm”.

In our research, we observe the chronic effect of phthalates and alkylphenols, treating mice to adulthood with a mixture of them. In the sperm of these mice, we studied their functionality, the changes in RNA content, the expression levels of the main enzyme involved in the production of estradiol *Cyp19a1*, of a receptor involved in its *Erβ* signaling and of the miRNAs that have them as target. On the other hand, we evaluated the acute effect of these toxins with one *in vitro* models, mouse spermatozoa exposed to NP as well and DEHP, in which we determined their effect on the AR and capacitation. To do this, we used three techniques for evaluating the AR, *Western Blot*, PCR, qPCR and RNAseq.

Our results showed that the two environmental toxicants used in this study (NP and DEHP) and probably others that have not yet been tested, induce AR and activate signaling pathways that involve PKA, the main kinase that modulates sperm and sperm capacitation. therefore, they could affect fertility *in vivo* by changing the timing or anatomical site of AR and training. Regarding chronic exposure to the mixture, our results indicate that it has an initial obesogenic effect and induces a decrease in plasma testosterone levels and an imbalance of the Testosterone / Estradiol ratio. On the other hand, with regard to sperm, we show for the first time that in sperm from mice chronically exposed to low doses of a mixture of phthalates and alkylphenols, from an early embryonic stage to adulthood, there are important alterations in the RNA and particularly a deregulation of the expression of miRNAs so relevant in many cell types, such as the 34/449 family. Additionally, our results suggest that the mixture of phthalates and alkylphenols alters the histology, decreases the expression of aromatase (*Cyp19a1*), affects the testosterone / estradiol balance and deregulates the levels of miRNAs that target genes relevant to spermatogenesis and oogenesis in the testis and ovary of exposed mice. In conclusion, the acute exposure of mouse spermatozoa to phthalates and alkylphenols, the chronic exposure of mouse to a mixture of these same compounds, at a similar dose that humans exposition, affect the RA, the capacitation, produces hormonal and genetic alterations, that can have an impact on male fertility.

3. DEFINICIÓN Y ABREVIATURAS

ATP: Adenosine triphosphate

Ago8: Argonaute 8

BBP: Ftalato de bencilo y butilo

BPA: Bisphenol A

[Ca⁺²]_i: Calcio intracelular

cAMP: ciclic Adenosin Mono Phosphate

CBB: Comassie Brilliant Blue

cDNA: complementary Desoxiribonucleoid acid

CG-2: Células derivadas de línea celular germinal masculina de ratón

Cyp19a1: Aromatasa

DBP: Ftalato de dipentilo

DEHP: Ftalato de bis 2-etilhexilo

DEs: Disruptores Endocrinos

Dicer: Ribonucleasa miembro de la familia de RNAsas III

Dgcr8: componente del complejo microprocesador de Pri-miRNAs

DNA: Desoxiribonucleoid acid

Drosha: Ribonucleasa miembro de la familia de RNAsas III

DsRed2: Red fluorescent protein

E₂: Estradiol

Er: Estrogen receptor

Gper30: G protein coupled estrogen receptor

Errγ: Estrogen related receptor gamma

Era: Estrogen receptor alpha

Erβ: Estrogen receptor beta

FIV: Fecundación “*in vitro*”

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

Hsd17β1: Hidroxiesteroide deshidrogenasa 17β1

IP: Yoduro de Propidio

Knock in: Introducción de un cDNA en un locus particular del cromosoma de un organismo

KO: (Knock out) supresión de la expresión de un gen específico en un organismo

Knock in de doble gen [BDF1-Tg (CAG-mtDsRed2, Acr-EGFP): Ratón doble *Knock in* que expresa EGFR en el acrosoma y mtDsRed2 en las mitocondrias

LOAEL: Lowel Observed Adverse Level

miRNAs: microRNAs

NP: 4-Nonilfenol

OMS: Organización Mundial de la Salud

OP: 4 terc-Octilfenol
P4: Progesterona
pH: Potencial de Hidrógeno
pHi: Potencial de Hidrógeno intracelular
PKA: Protein Kinasa A
PKC: Protein Kinasa C
pPKAs: Phosphorylated Protein Kinase A substrates
pYs: Phosphorylated Tyrosine substrates
qRT- PCR: Real Time Reverse Transcription Polimerasa Chain Reaction
RA: Reacción Acrosómica
RIA: Radio Immuno Assay
RISC: RNA Induced Silencing Complex
RNA: Ribonucleid Acid
mRNA: messenger RNA
rRNA: ribosomal RNA
RT-PCR: Revese Transcription Polimerasa Chain Reaction
SACY: Soluble Adenyl Cyclase
scRNA: single cell RNA
siRNA: small interference RNA
snoRNA: small non- coding RNA
lncRNA: long non-coding RNA
piRNA: piwi associated RNA
Pri-miRNA: Pri-microRNA
Pre-miRNA: Pre-microRNA
T: Testosterona
T/E₂: Razón testosterona estradiol
tRNA: transference RNA
Tyr: Tirosina
VGCC: Voltage Gate Calcium Channel

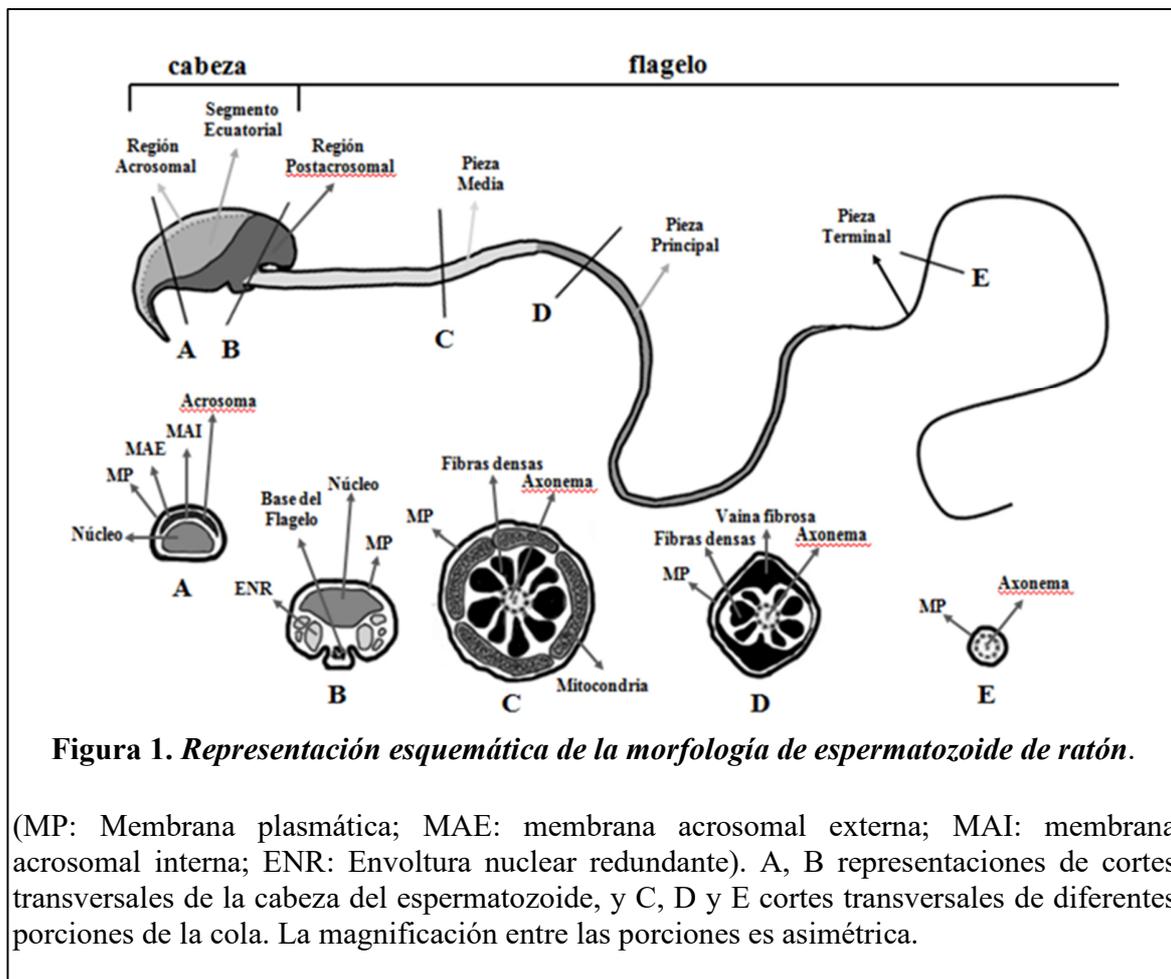
4. INTRODUCCIÓN

Este año la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la infertilidad es un problema de salud mundial que afecta a millones de personas en edad de procrear en todo el mundo. Los datos muestran que entre 48 millones de parejas y 186 millones de personas tienen infertilidad en todo el mundo. Por lo anterior, es relevante abordar la infertilidad como un aspecto de la realización del derecho de los individuos y las parejas a fundar una familia, que cuando no se cumple tiene impactos negativos en la salud de las personas, su familia y su comunidad[1-3]. Más específicamente, hoy en día, aproximadamente un 15% de las parejas en edad reproductiva son infértiles y un 50% de los casos de infertilidad son atribuidos a factor masculino lo que, según varios autores, se relaciona con un decline en la calidad del semen[4, 5]. Por otro lado, la infertilidad masculina es multifactorial, pero el 35% de los hombres infértiles permanece sin un diagnóstico etiológico (infertilidad masculina idiopática), sugiriendo la necesidad de continuar investigando las probables etiologías para este tipo de infertilidad[6, 7]. Además, es importante destacar que la evidencia científica muestra que la prevalencia de la infertilidad está aumentando, en parte, por la influencia en la salud y en la fertilidad, de hábitos o factores que caracterizan al estilo de vida actual[8, 9]. Entre los factores que impactan negativamente la salud general y reproductiva, destaca el efecto de disruptores endocrinos (DEs), los cuales pueden alterar el desarrollo y función gonadal[10]. Los DEs son químicos contenidos en productos de uso cotidiano para el hombre tales como plásticos, detergentes, cremas, cosméticos, pinturas, etc. La información en modelos animales muestra que los principales DEs que forman parte de los plásticos, los ftalatos y alquilfenoles, pueden perturbar distintas etapas en el proceso de la reproducción,

lo que lleva a una disminución de la fertilidad[11-13]. Sin embargo, actualmente existe controversia sobre el real efecto de los DEs sobre la fertilidad masculina, en parte porque los mecanismos moleculares implicados en su acción no están claros y porque no se ha encontrado una relación causal entre la exposición a DEs e infertilidad masculina[14]. Por lo anteriormente descrito, nos interesó estudiar si la exposición a DEs afecta la fertilidad masculina, mediante uno de los mecanismos implicados en este efecto en humanos y modelos animales. Por otro lado, existe poca evidencia sobre los efectos de los DEs sobre el producto final de la espermatogénesis, que es el espermatozoide y sobre la posible alteración de su capacidad de fecundar y/o de su contenido de RNA. Dentro de los RNA que han adquirido importancia en investigaciones recientes en relación al espermatozoide, se encuentran los microRNAs (miRNAs) y los transcritos que modulan procesos relacionados con la función del espermatozoide[15-17]. Por ello, en esta investigación estudiamos si la exposición aguda de espermatozoides a ftalatos y alquilfenoles perturba procesos implicados en la fecundación y si la exposición crónica, a una mezcla de ellos, durante el desarrollo embrionario hasta la vida adulta, modifica el perfil y contenido de RNA, la expresión de la enzima aromatasa (*Cyp19a1*) y del receptor nuclear de estrógeno *Erβ*, vía la desregulación de miRNAs que los modulan. Para ello usamos un modelo murino de exposición aguda y crónica a DEs y estudiamos si hay una desregulación de procesos biológicos relacionados con la fecundación en espermatozoides de ratones tratados con ftalatos y alquilfenoles y por otro lado, si los espermatozoides de ratones expuestos en forma crónica a una mezcla de ftalatos y alquilfenoles presentan una modificación del perfil y contenido de RNA, la expresión de la enzima aromatasa (*Cyp19a1*) y del receptor nuclear de estrógeno *Erβ*, vía la desregulación de miRNAs que los modulan.

4.1. La singularidad biológica del espermatozoide y de los procesos que lo habilitan para fecundar.

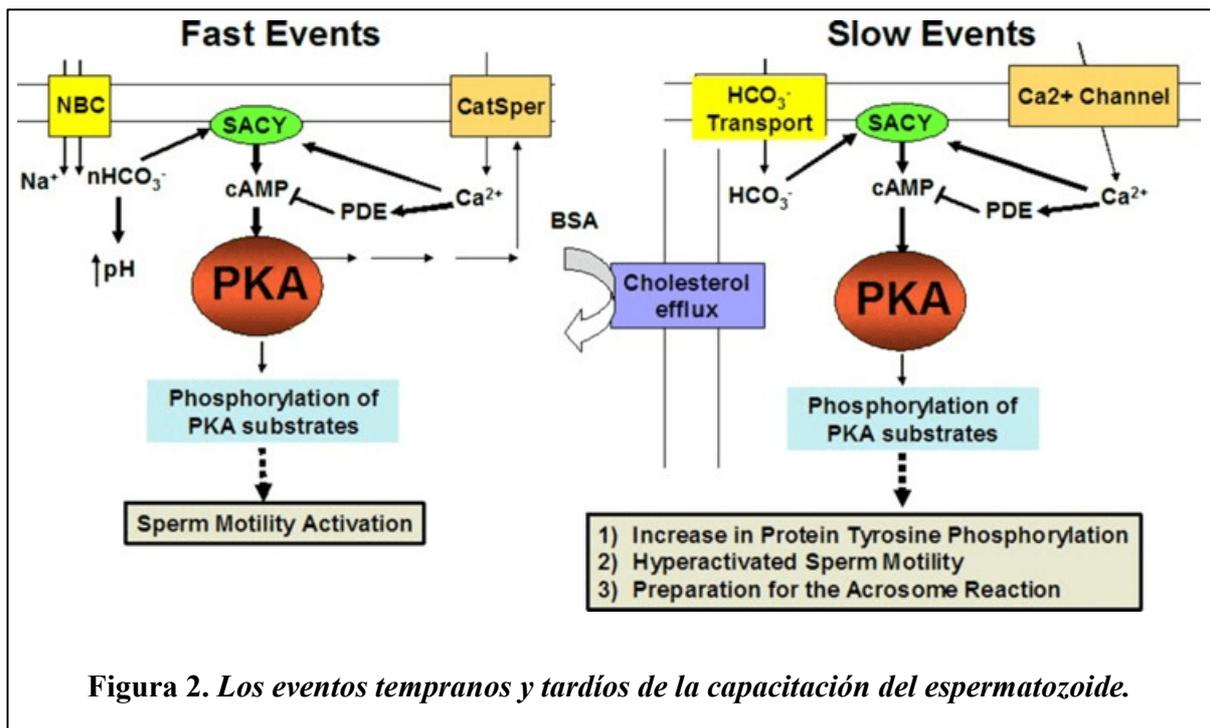
El espermatozoide es una célula diferenciada, haploide y que cuenta con un flagelo que le otorga una gran cabeza se encuentra el núcleo y el acrosoma (una vesícula de secreción), en la cola se encuentran las mitocondrias agregadas en una zona llamada pieza media, el resto de la cola se denomina segmento principal Esta célula se puede dividir funcionalmente en dos partes: cabeza y cola (Figura 1). La espermatogénesis es una secuencia de eventos coordinados y regulados que concluyen con la diferenciación de una célula germinal redonda haploide, la espermatida, a un espermatozoide que es una célula altamente especializada, alargada y diferenciada cuyas características lo habilitan para transportar el genoma paterno al ovocito[18, 19]. Luego de la espermatogénesis, el espermatozoide también experimenta la maduración post-testicular cuyo objetivo es limitar la cantidad de organelos presentes en su citosol y la capacidad transcripcional. Posteriormente, durante el almacenamiento y tránsito del espermatozoide por el epidídimo, experimenta una serie de modificaciones post-traduccionales que le confieren un gran número de estructuras y proteínas funcionalmente competentes[20]. Todas estas características morfológicas y funcionales son las que hacen que el espermatozoide sea diferente a otras células germinales y somáticas[21].



(MP: Membrana plasmática; MAE: membrana acrosomal externa; MAI: membrana acrosomal interna; ENR: Envoltura nuclear redundante). A, B representaciones de cortes transversales de la cabeza del espermatozoide, y C, D y E cortes transversales de diferentes porciones de la cola. La magnificación entre las porciones es asimétrica.

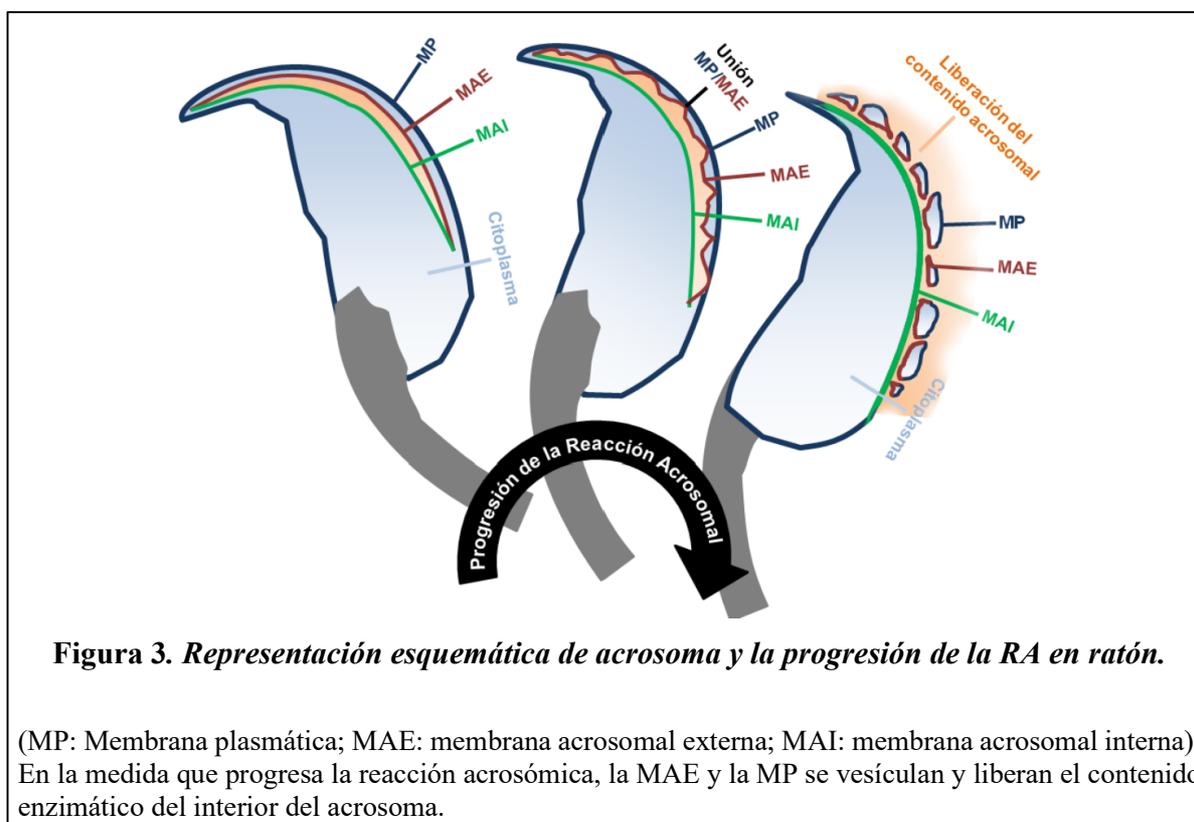
El proceso de maduración del espermatozoide se mantiene durante su ingreso al tracto genital de la hembra, donde ocurre un proceso biológico post-traduccional muy relevante, denominado capacitación. La capacitación fue descrita en 1951 por Chang y Austin, quienes paralelamente, descubrieron que los espermatozoides contenidos en el eyaculado de mamíferos son incapaces de fecundar al ovocito antes de pasar un periodo de tiempo en el tracto genital femenino, o bien posterior a una incubación “*in vitro*”, en un medio químicamente definido [22-24]. El espermatozoide debe cumplir tres hitos importantes y característicos: motilidad progresiva, motilidad hiperactivada y reacción acrosómica (RA). En relación a lo anterior, “*in vitro*” se

han caracterizado eventos tempranos y tardíos que ocurren durante la capacitación y que son modulados por moléculas pertenecientes a una vía de señalización que implica a PKA (cinasa de Ser/Thr dependiente de cAMP). Los eventos tempranos de la capacitación ocurren en segundos, cuando el espermatozoide toma contacto con el medio extracelular del tracto genital femenino o de un medio de capacitación “*in vitro*”, que contiene una mayor concentración de HCO_3^- , Ca^{+2} y albumina que el medio extracelular del epidídimo[25]. Dentro de los eventos tempranos están la adquisición de la motilidad progresiva y la activación de PKA estimulada por el aumento de cAMP[26, 27]. El cAMP es producido por la acción de la enzima adenilato ciclasa soluble (SACY), que es activada por HCO_3^- y Ca^{+2} , a diferencia de la enzima adenilato ciclasa unida a membrana, presente en otros tipos celulares[28]. La activación de PKA es crucial, ya que fosforila sus proteínas diana en Ser/Thr y se desencadenan múltiples vías de señalización permitiendo el progreso de la capacitación[25]. El comienzo de los eventos tardíos depende de la remoción del colesterol de la membrana plasmática donde la albúmina juega un rol como aceptor de colesterol. Dentro de estos eventos, se encuentran la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (Tyr), que generalmente, se encuentran en el flagelo[29, 30]. La fosforilación en Tyr requiere periodos de incubación de horas y es crucial, porque de no ocurrir, el espermatozoide no experimenta la RA y no puede fecundar[25, 31]. La fosforilación en Tyr también depende de la activación de PKA, de la albúmina sérica, HCO_3^- y Ca^{+2} . La motilidad hiperactivada del espermatozoide es otro evento muy relevante y tardío condicionado por la alcalinización del pH intracelular (pH_i) y del aumento del Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{+2}]_i$ en el espermatozoide. La hiperactivación es necesaria para que el espermatozoide llegue al oviducto, alcance al ovocito y ocurra paralelamente al desarrollo de la capacidad de experimentar la RA [25, 32], (Figura 2).



Durante la capacitación los componentes de la membrana plasmática se reorganizan, generando mayor fluidez y capacidad de fusionarse para permitir la RA (Figura 2) [33]. La RA es un evento de exocitosis, secuencial y dependiente de Ca^{+2} , que puede ser inducido por agentes fisiológicos como la progesterona (P4), ATP y/o glicoproteínas de la zona pelúcida del ovocito, entre otros [34, 35]. La capacidad del espermatozoide de experimentar la RA en respuesta a un inductor, determina su competencia para fecundar al ovocito y pone fin a la capacitación [36]. La RA implica múltiples puntos de fusión entre la membrana acrosómica externa y la membrana plasmática adyacente del espermatozoide (Figura 3). Esta fusión resulta en la generación de poros que permiten la salida de las proteasas contenidas en el acrosoma, permitiendo al espermatozoide penetrar la zona pelúcida [37]. El acrosoma contiene componentes solubles y una matriz proteica compuesta por proteasas glicosiladas y varias proteínas de adhesión que interactúan entre sí. El pH_i acrosomal es ácido, manteniendo las

proteasas en estado inactivo y se alcaliniza durante la capacitación y RA, provocando la descondensación de la matriz y la liberación del contenido acrosomal. El medio extracelular en que se encuentra el espermatozoide, “*in vivo*” o “*in vitro*”, puede influenciar la ocurrencia de la RA y la liberación de sus componentes[38, 39]. En relación a lo anterior, en el oviducto [40] durante la ovulación, la P4 es sintetizada activamente por las células de la granulosa que conforman el cúmulo oóforo y es capaz de inducir la RA mediante una vía no genómica que favorece el ingreso de Ca^{+2} , a través de canales de Ca^{+2} aún no bien identificados. De la misma manera se ha postulado que el ATP extracelular presente en el oviducto pudiese cumplir una función parecida[41]. Al respecto, se sabe que, en espermatozoides humanos la P4 activa a los canales de calcio específicos del espermatozoide (CatSper), que están implicados en la hiperactivación del espermatozoide, pero su relación directa con la RA no está clara[42-44].



El mecanismo molecular implicado en el efecto de P4 en la RA del espermatozoide de ratón no se conoce claramente, pero participan de canales de calcio dependientes de voltaje (VOCC) presentes en la membrana plasmática de la porción acrosomal[45, 46] Está establecido que P4 induce la RA, pero la información sobre el efecto de estrógenos (E₂) en este evento, es contradictoria y sugieren que inhibe la RA[47-49]. En relación a tóxicos ambientales químicamente similares a estrógeno, como son los ftalatos y alquilfenoles, cuya acción está determinada porque principalmente interactúan con los receptores de estrógeno (Er) cabe mencionar que con la escasa evidencia que existe se ha propuesto que estimulan la capacitación y RA vía activación de los Er GPER30, *Erβ* o por proteínas de asociación a estrógeno, que han sido detectadas en espermatozoides maduros[50-52]. Las investigaciones recientes sugieren que los DEs también pueden activar a los CatSper induciendo un aumento del $[Ca^{+2}]_i$ desencadenado la RA[53, 54]. Por otro lado, se ha sugerido la implicancia de la PKA en la RA del espermatozoide de mamífero, ya que la activación de SACY y la generación de cAMP incrementan durante la RA e inhibidores de PKA suprimen este proceso[55]. Dada la información que muestra que los DEs están presentes en diferentes tejidos y fluidos humanos, dentro de los cuales se encuentra el plasma seminal, el semen y el fluido folicular y la placenta, es relevante preguntarse el efecto agudo que pueden tener estos compuestos en proceso biológicos tan finamente modulados, como la capacitación que implica la activación de PKA, la inducción de la RA y la fosforilación de sustratos en Ser/Thr y de sustratos en Tyr [56-60].

4.2. El paradigma del espermatozoide y su RNA.

La organización de la cromatina del espermatozoide difiere significativamente al de las células somáticas, en las que la cromatina se empaqueta en nucleosomas que contienen 146 pb de DNA envuelto alrededor de un octámero de proteínas básicas llamadas histonas[61].

En los espermatozoides de mamíferos, la cromatina está organizada en una estructura muy compacta, descrita como un "bucle de rosquilla" o "toroide" en el que el DNA se envuelve aún más alrededor de proteínas básicas más pequeñas, llamadas protaminas. Como resultado, el núcleo del espermatozoide es aproximadamente siete veces más pequeño, que el de una célula somática en interfase[62]. La mayoría de las histonas son reemplazadas por protaminas, pero algunas persisten en el espermatozoide maduro[63] .

Hasta hace poco, la existencia de restos de histonas en el espermatozoide maduro se consideraba como el resultado de un proceso de reemplazo ineficiente. En relación con lo anterior, actualmente está bastante claro para la comunidad científica, que las histonas que permanecen en el espermatozoide contribuyen a la entrega de información paterna al ovocito y al embrión en desarrollo[63]. Sin embargo, aún persiste el debate sobre la ubicación genómica de esas histonas[64]. Por ello y en base a toda la información reciente sobre la función de las histonas del espermatozoide, en la actualidad está en revisión el concepto que hasta hace poco era incuestionable que planteaba que el espermatozoide solo transmite su DNA y cromatina al ovocito y embrión, dado que actualmente se reconoce que además, hay varias marcas epigenéticas en el DNA, asociadas proteínas de la cromatina que contienen una compleja gama

de RNA (tanto codificantes como no codificantes) presentes en el espermatozoide[65].

A partir de los descubrimientos sobre las histonas y las características de la cromatina ya descritas, comenzó el estudio sobre la importancia y función de los RNA presentes en el espermatozoide, principalmente a partir del exhaustivo trabajo realizado por Stephen Krawetz y sus colegas, quienes descubrieron que muchas especies de RNAs están presentes en el espermatozoide de los mamíferos y que se pueden entregar al ovocito tras la fecundación [66-68]. Posteriormente, esta información se ve robustecida por la investigación realizada en el laboratorio de Mino Rassoulzadegan que mostró que el inyectar RNA extraído de espermatozoide o de tejido somático de ratones transgénicos (e incluso RNAs sintetizados) en cigotos control, puede tener efectos profundos en el desarrollo de la descendencia y transferir fenotipos complejos a través de generaciones posteriores [69, 70]. Posteriormente y en forma simultánea, diferentes laboratorios identificaron que el contenido de RNA del espermatozoide se puede modificar, en respuesta a experiencias durante la vida[71, 72]. Específicamente, se demostró que experiencias tempranas traumáticamente estresantes inducen cambios metabólicos y del comportamiento en ratones, que podrían transmitirse a través de los RNAs contenidos en los espermatozoides a la descendencia. En los pocos años transcurridos desde entonces, otros laboratorios han informado hallazgos similares en estudios centrados también en factores causantes de estrés, tales como dieta, tóxicos medioambientales y han comenzado a centrarse en RNAs específicos, en particular, miRNAs, como portadores de información específica[17, 73-76]. Solo recientemente, los tRNAs fragmentados y sus modificaciones también se han sugerido como portadores de información trans generacional[77], y se está acumulando rápidamente información reciente que muestra que diversos desafíos ambientales inducen cambios en la carga de RNA de los espermatozoides[65, 78]. Los estudios

epidemiológicos de exposición a ftalatos y alquilfenoles en adultos y el análisis del semen, sugieren que algunos ftalatos y alquilfenoles están asociados con morfología anormal de los espermatozoides[79], disminución de la concentración de espermatozoides[80] estrés oxidativo y metilación del DNA[81]. Entre las parejas que se someten a FIV, las concentraciones de ftalatos urinarios en la pareja masculina se correlacionan inversamente con blastocistos de alta calidad, lo que sugiere un efecto masculino. Hasta hoy, el impacto intergeneracional de la exposición a ftalatos y alquilfenoles sigue siendo desconocido y la cantidad de estudios con modelos intergeneracionales murinos es limitado, por lo que se justifica la investigación sobre la exposición crónica a DEs porque simulan y reflejan certeramente el tipo de contaminación a la que los humanos hemos estado expuestos por décadas[82].

Finalmente, los datos en humanos sugieren que las experiencias paternas pueden tener consecuencias fenotípicas en la descendencia y se sospecha que el efecto intergeneracional está mediado por mecanismos epigenéticos, en parte por el RNA y/o la cromatina y sus modificaciones transferidas por el espermatozoide en la fecundación[65].

4.3. El rol de estradiol en la reproducción masculina, la función testicular y en el espermatozoide.

Durante décadas los estrógenos han sido considerados hormonas femeninas. Sin embargo, la presencia del estrógeno en los hombres, se conoce desde hace más de 90 años[83].

Desde un punto de vista histórico, los estudios iniciales sugirieron que el estrógeno era perjudicial para la reproducción masculina, porque los tratamientos en modelos animales, con estrógenos exógenos indujeron anomalías del desarrollo reproductivo de machos expuestos[84, 85].

Las primeras etapas de la esteroidogénesis se llevan a cabo en las células de Leydig. La esteroidogénesis en humanos se inicia durante la 8 semana de gestación y en roedores alrededor del día 12 post-coito. Sin embargo, la síntesis de estrógenos en los testículos, las altas concentraciones de 17β -estradiol (E_2) en el líquido de la *rete testis* y en los vasos sanguíneos testiculares de casi todas las especies, sugirió que, en condiciones normales, el E_2 podría tener una función en la fisiología reproductiva masculina[83, 86, 87]. La identificación de los receptores de estrógenos y el desarrollo de radioisótopos biológicos como métodos para evaluar la unión de estradiol, revelaron que el tracto reproductivo masculino expresa ampliamente receptores de estrógenos desde el período neonatal hasta la edad adulta[88-91]. Esto indicó un papel para los estrógenos en el desarrollo normal del tracto reproductivo masculino, especialmente en los conductos eferentes, cuyo epitelio es el primero que tiene una alta expresión de receptores de estrógeno durante el desarrollo[92-95]. Posteriormente, en la década de 1990, se produjo un cambio de paradigma en la comprensión de la función de los estrógenos en el macho, debido a la introducción de modelos de ratón *knock out* (KO) donde la producción de estrógenos o la expresión de sus receptores no estaba presente. Estos animales KO revelaron que el principal receptor de estrógeno *Era* es esencial para la fertilidad masculina y el desarrollo de conductos eferentes, epidídimo y próstata, y que la pérdida de sólo la fracción de membrana de *Era*, es suficiente para inducir extensas anomalías reproductivas masculinas e infertilidad[96-98].

Los efectos de E₂ en el desarrollo testicular y en la fertilidad masculina humana, se comenzaron a considerar con mayor atención e interés, a partir la década de los 70 cuando hubo reportes de efectos negativos en la calidad de los espermatozoides y una alta incidencia de malformaciones genitales, criptorquidia y cáncer testicular en los hijos de madres tratadas con dietilestilbestrol, un estrógeno sintético usado para la prevención de abortos y partos prematuros durante los años 1950 a 1970[99-103]. Por ello, la mayoría del conocimiento sobre el rol fisiológico de E₂ en la espermatogénesis humana proviene de información indirecta, basada en los efectos de dietilestilbestrol en la fertilidad de los hijos de madres tratadas. Cabe destacar que este fue uno de los primeros datos que se tuvo, en cuanto a que, la exposición intrauterina a estrógenos externos afecta el desarrollo y la reproducción en los hijos de las madres que recibieron este tratamiento, es decir, afecta la reproducción masculina de los seres humanos, porque como ya se ha mencionado, existían resultados similares en modelos animales[104]. La influencia de los estrógenos en la fertilidad masculina humana aún no está completamente clara, pero la evidencia científica muestra que en aquellos trastornos que involucran hiperestrogenemia (Ej: tumores de las glándulas adrenales que producen E₂), se han observado efectos supresores sobre las gonadotropinas y un decline en la calidad del semen[105].

Por otra parte, en relación a la misma línea de pensamiento, la supresión de la liberación de gonadotropinas y el decline de la calidad de los espermatozoides, puede revertirse mediante la administración de antiestrógenos, mostrando una clara influencia moduladora de E₂ sobre la espermatogénesis y los procesos implicados en ella, en seres humanos[106-108].

La evidencia directa basada en ensayos con modelos animales propone que E₂, en conjunto con FSH y/o testosterona, incrementa y adelanta temporalmente el inicio de la espermatogénesis, aumentando la proliferación de las células germinales mediante un efecto protector

antioxidante y antiapoptótico, que es completamente opuesto a la acción de E₂ por sí solo [109-111]. Dado esto, la relación andrógenos/estrógenos es imprescindible para la función testicular, especialmente durante el desarrollo [112].

Actualmente se sabe que en el testículo las fuentes de E₂ son las células de Sertoli, las células de Leydig y los últimos descubrimientos muestran que las células germinales también generan E₂.

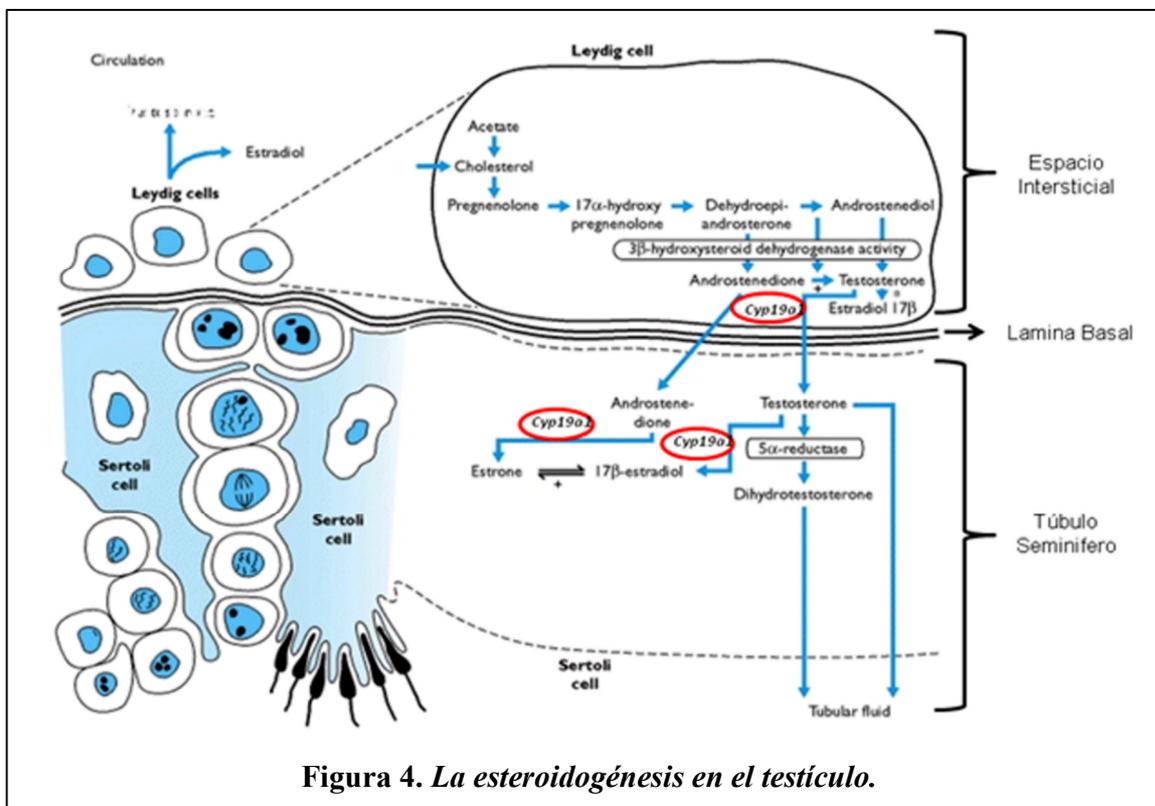


Figura 4. La esteroidogénesis en el testículo.

Por ello, el balance entre testosterona y E₂ es modulado, principalmente, por la presencia y actividad de las enzimas Cyp19a1 y 17 β hidroxisteroide deshidrogenasa [113, 114]. La función

de la *Cyp19a1*, es catalizar el último paso en la biosíntesis de estrógenos. En el testículo la *Cyp19a1* está localizada en los túbulos seminíferos, principalmente en el citoplasma de células de Leydig, pero también en células de Sertoli y en células germinales de diferentes estadios de diferenciación, incluyendo la pieza media y pieza principal del flagelo del espermatozoide [115] (Figura 4).

En cuanto al rol de *Cyp19a1* en el espermatozoide, por un lado, se ha visto que en ratas la *Cyp19a* se activa durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo, que en ratones la principal fuente de estrógenos en el epidídimo es la *Cyp19a* presente en los espermatozoides y que en los espermatozoides humanos recién eyaculados la *Cyp19a* está activa [116-118]. Por otro lado, investigaciones implican a la *Cyp19a1* en la regulación de la morfología y motilidad del flagelo del espermatozoide [116, 119-122]. Es por todo lo anterior que, tanto los ratones KO para *Cyp19a1*, como los hombres con polimorfismos de *Cyp19a1* son infértiles por alteraciones progresivas de la función de sus espermatozoides. También, E₂ ejerce su efecto en el testículo y en el espermatozoide a través de sus receptores (*Era* y *Erβ*) [123-125]. Al igual que *Cyp19a1*, las dos isoformas del receptor de estradiol *Era* y *Erβ* están presentes en la cola y mitocondrias de espermatozoides de mamíferos, sin embargo, una excepción es el espermatozoide de ratón en el que hasta ahora sólo se ha descrito la presencia de *Erβ* [126-129]. Aun así, la información sobre ratones KO para *Erβ* y *Era* muestra que son infértiles [126, 128].

Por añadidura, estudios realizados en hombres con infertilidad, indican que sus espermatozoides presentan alteraciones morfológicas, de motilidad y menores niveles de mRNA para *Era* y *Cyp19a1* [130, 131]. Toda esta información muestra que la fisiología testicular y particularmente, el espermatozoide, son muy sensibles a perturbaciones en el balance entre andrógenos y estrógenos, el que puede ser afectado por factores implícitos en el

estilo de vida actual como es la contaminación ambiental con DEs, alterando como consecuencia la fertilidad[132-134]. Finalmente, la acumulación de información relevante en cuanto a la función de las hormonas esteroidales y otros morfógenos en la modulación del desarrollo, diferenciación y maduración del sistema reproductivo, explican su exquisita sensibilidad a la desregulación causada por moléculas que imitan o afectan las acciones de las hormonas esteroidales[135-137]. Por ello, aún persisten los estudios sobre el efecto a largo plazo y sobre las consecuencias de las interacciones "ambiente- célula" y "ambiente- genoma" durante las ventanas críticas de desarrollo de los sistemas reproductivos masculino, femenino y sobre los mecanismos que regulan estas interacciones. Por esta razón, la exposición durante el desarrollo vital a sustancias químicas disruptoras endocrinas estrogénicas y antiandrogénicas se asocia con disfunción reproductiva en la edad adulta[138].

4.4. Efecto de los DEs sobre la reproducción y el espermatozoide.

El efecto de los DEs, sigue siendo una preocupación para la salud humana y la vida silvestre[139, 140]. Los DEs son sustancias exógenas que alteran la función del sistema endocrino, causando efectos negativos, en la salud de un organismo intacto, su progenie o población[10]. Como los ftalatos y alquilfenoles tienen actividad antiandrogénica y estrogénica, respectivamente, y estudios indican que actúan sobre el testículo y células germinales, son clasificados como DEs[141-143]. Dado esto, los ftalatos y alquilfenoles pueden interferir la acción de hormonas endógenas responsables de la homeóstasis, reproducción y desarrollo mediante la alteración de la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de hormonas[144].

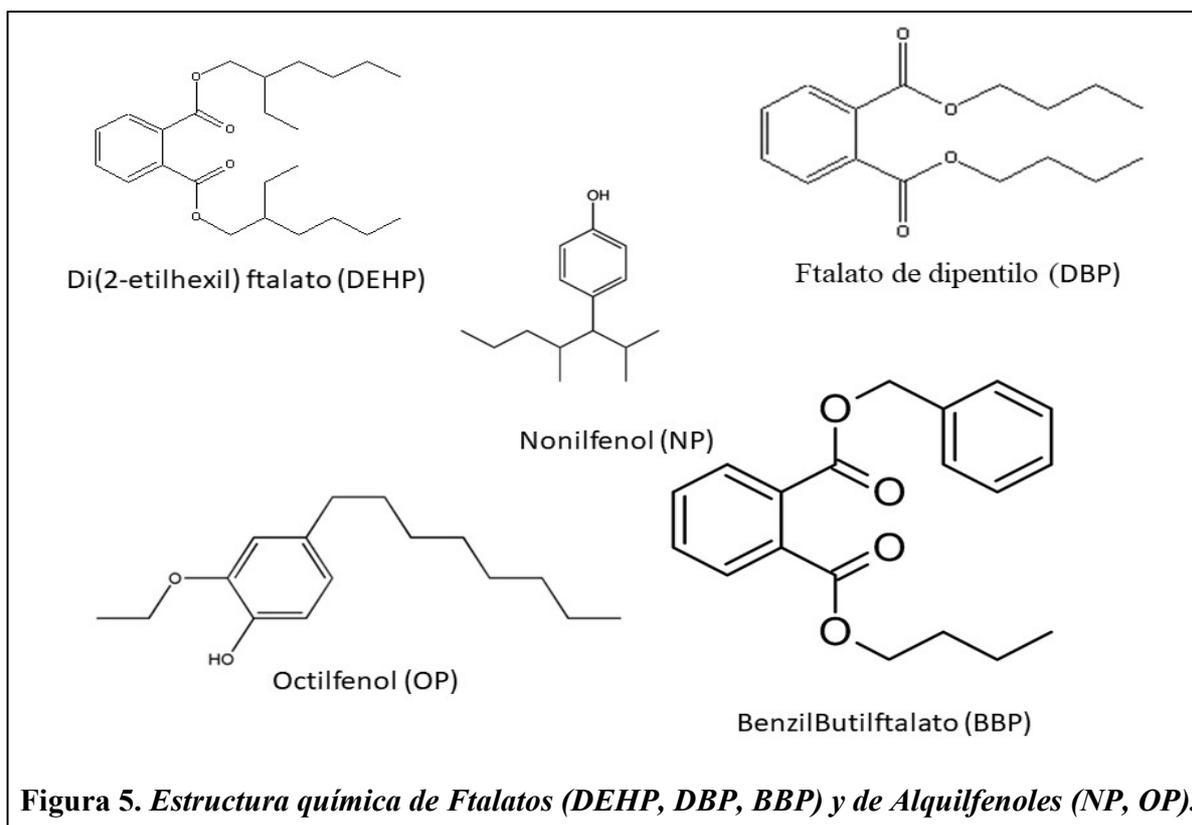
A pesar de que los estudios para evaluar químicos con un efecto disruptor lleva más de tres décadas, pocos compuestos de esta clase se han podido evaluar minuciosamente. Identificar las sustancias químicas que son posibles disruptores endocrinos es un desafío significativo debido a la complejidad de los procesos que están bajo el control endocrino, el retraso temporal entre la exposición a sustancias químicas y los efectos adversos y la variabilidad de las dosis cuya respuesta tiene que ver con el género y etapa de la vida[145]. La identificación se complica aún más por la necesidad actual de identificar los efectos mecanicistas, efectos en animales, y la vinculación entre ambos. Ha habido algunos avances en el desarrollo de enfoques “*in silico*” e “*in vitro*” para la detección rápida sustancias químicas para los efectos sobre los receptores nucleares de hormonas esteroidales, pero para algunos mecanismos de acción, todavía no hay métodos adecuados disponibles por lo que, aún se requieren más estudios en relación a las vías endocrinas que pueden ser perturbadas por múltiples blancos de receptores nucleares con efectos intermedios. Dadas todas las dificultades ya descritas, es necesario la utilización de métodos y modelos con enfoques de investigación relacionados con la toxicología moderna en que se incluye el concepto de “vía de resultado adverso”, que describe la actividad de una sustancia química desde su interacción inicial con un sistema biológico (el evento iniciador molecular) a través de una serie de eventos intermedios hasta la respuesta tóxica eventual (resultado adverso), lo cual fundamenta el diseño experimental del modelo “*in vivo*” planteado en esta investigación[146, 147].

Diversos estudios muestran una asociación entre los niveles de DEs con un incremento de la infertilidad[148-150]. El impacto de estos compuestos sobre la salud reproductiva varía según el periodo del desarrollo en que ocurre la exposición, ya que hay etapas que son más

sensibles que otras al efecto nocivo de DEs[151-153]. De igual manera, los humano y los animales tienen contacto con una mezcla de DEs que se encuentran en el medio ambiente en forma simultánea, especialmente en el agua, en los alimentos, e inclusive en el aire, que ha incrementado su contenido de DEs en zonas industrializadas y sin regulación ambiental[154-157]. Los principales DEs que componen los plásticos y los detergentes, que se encuentran en utensilios de uso común, en el ambiente, así como en fluidos de humanos, son los ftalatos (Figura 5): Ftalato de bis 2-etilhexilo (DEHP), Ftalato de dipentilo (DBP), Ftalato de bencilo y butilo (BBP) y los alquilfenoles: 4-Nonilfenol (NP), 4-terc-Octilfenol (OP). Cabe destacar, que la combinación de estos tóxicos tiene efectos adversos mayores que cada compuesto en forma individual, lo que refleja las propiedades aditivas de los DEs[158-162]. Por ejemplo, en un reconocido y aún vigente estudio, realizado por Brian el año 2005, se estudió como respuesta el efecto inductor de la expresión de vitelogenina en peces machos, de 5 compuestos estrogénicos en forma individual y combinada. Esta investigación mostró que en bajas concentraciones cada xenoestrógeno no causó una respuesta tan significativa, en comparación, al efecto de la combinación de ellos [163, 164]. Además, las respuestas fisiológicas y toxicológicas a estos compuestos pueden ser no- monotónicas o bifásicas, por lo que bajas concentraciones de DEs pueden generar más alteraciones que concentraciones mayores, o viceversa[165, 166]. Por añadidura, estos contaminantes actúan en diferentes órganos y son excretados por el hombre sólo en un 50%, ya que se bioacumulan en el tejido adiposo o persisten en diferentes fluidos corporales[167-170].

Igualmente cabe mencionar que hay pocos estudios que investigan el efecto de mezclas de ftalatos y/o alquilfenoles sobre el sistema reproductivo de mamíferos[171-173]. Además, las escasas investigaciones no exploran los efectos producidos por dosis menores a las LOAEL

(dosis más baja que induce efectos adversos observables) para cada compuesto, que son las dosis similares a las que estamos expuestos los seres humanos[174-176].



El testículo es un órgano blanco para la acción de DEs debido a que LH, FSH, estrógenos y andrógenos, participan coordinadamente, en el desarrollo gonadal y en la espermatogénesis[177, 178]. En relación a lo anterior, diferentes estudios sugieren que la exposición intrauterina y perinatal a DEHP, BBP y DBP o a su mezcla, causa malformaciones del tracto genital masculino como hipospadias o criptorquidia y afecta el desarrollo testicular generando disminución en la producción de testosterona, diferenciación anormal de células germinales, incremento en la apoptosis, para posteriormente, favorecer la producción de

células cancerígenas[179]. Por ello, los DEs se asocian al síndrome de disgenesia testicular (SDT) que agrupa a patologías, conducentes a subfertilidad o infertilidad[180-182]. En cuanto al mecanismo de acción de ftalatos y alquilfenoles, no está claro si el efecto nocivo de estos compuestos en el desarrollo testicular se debe a su acción genómica, epigenómica, post-transcripcional o a todas ellas[183, 184]. En relación a ello, las investigaciones sugieren que un alquilfenol, Bisfenol-A altera la meiosis y tiene efectos mutagénicos en células germinales de ratas adultas, pero no existe información al respecto de NP, OP, ftalatos o su mezcla[185-187]. La evidencia sobre los efectos epigenéticos de ftalatos muestra que la exposición intrauterina y perinatal a DEHP en ratones aumenta la metilación global del genoma del testículo[188-190]. Además, el DEHP es el ftalato más empleado en la industria plástica, por lo que su efecto disruptor es intensamente investigado. Referente a lo anterior, en un estudio realizado en trabajadores de una fábrica de PVC en China, a los que se les midió niveles urinarios de metabolitos de DEHP, indica que estos hombres presentan disminución de la concentración, motilidad y alteraciones en la morfología de los espermatozoides y un aumento los metabolitos generados por la actividad de *Cyp19a1*, sugiriendo que la exposición a DEHP se correlaciona con infertilidad masculina [191, 192].

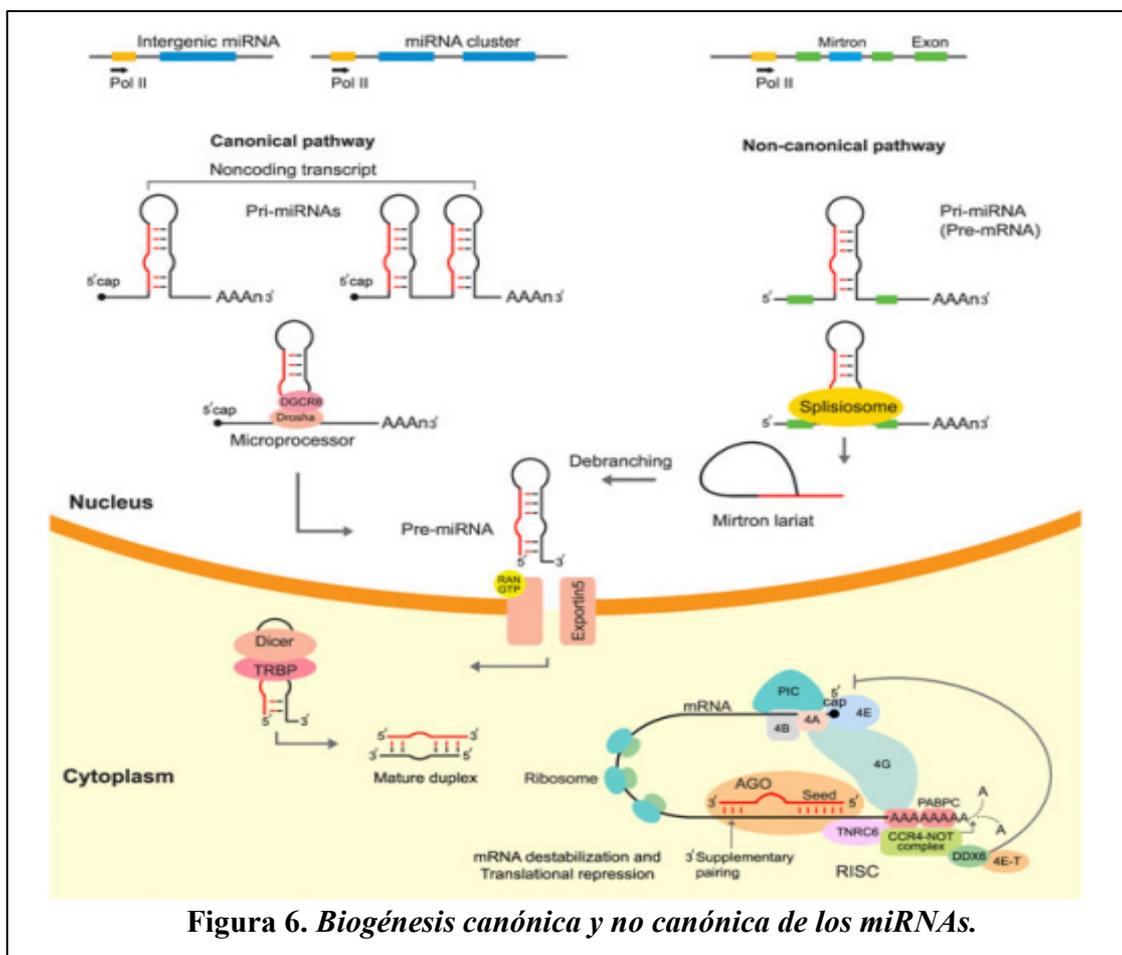
Por otro lado, algunos DEs estimulan vías no genómicas que regulan la maduración del espermatozoide, como las que son activadas durante la capacitación, el proceso de maduración final del espermatozoide en el tracto genital femenino[54, 193]. Al respecto, estudios muestran que alquilfenoles y ftalatos, tales como NP, OP y DBP inducen la capacitación y la reacción acrosómica (RA) de espermatozoides humanos, porcinos y de ratón, y también NP disminuye la motilidad y viabilidad de espermatozoides porcinos[50-52, 194]. En cuanto a lo anterior, los posibles mecanismos moleculares de estos efectos se sustentan en que los espermatozoides

maduros presentan receptores de E₂ y andrógenos, que al unirse a sus respectivos ligandos activarían vías de señalización implicadas en la capacitación y RA. También, existe un estudio que sugiere que ftalatos y alquilfenoles activan a los CatSper (canales de Ca²⁺ específicos del espermatozoide) produciendo influjo de Ca²⁺ en espermatozoide humano[53, 195].

Por añadidura, nuestros experimentos sugieren que NP, induce la RA del espermatozoide de ratón, que se relaciona con la evidencia que muestra que los alquilfenoles median la producción de segundos mensajeros, activando diversos receptores y vías de señalización[196, 197]. Por otra parte, la información sobre la acción de DEs en la maduración del espermatozoide en el epidídimo es escasa. Algunos experimentos muestran que la exposición de ratas adultas a alquilfenoles merma la concentración, motilidad e integridad del acrosoma de espermatozoides epididimales, sugiriendo que los alquilfenoles desregulan este proceso, sin que estén claros los mecanismos moleculares involucrados en este efecto. Por otro lado, hay investigaciones que muestran que la exposición aguda y crónica a ftalatos afecta la histología y morfología del epidídimo, un órgano tan relevante para la maduración final del espermatozoide[198-200]. En conclusión, los alquilfenoles y ftalatos afectan los procesos que generan espermatozoides, activando vías genómicas y no genómicas, pero los mecanismos moleculares implicados en estos efectos están aún en estudio. Por ello, es importante investigar, nuevas vías moleculares que expliquen los posibles efectos negativos de los alquilfenoles y ftalatos en la fertilidad masculina. Dentro de estas nuevas vías moleculares, se encuentra la regulación post-transcripcional de la espermatogénesis y maduración epididimal de los espermatozoides, mediada por miRNAs[201-203].

4.5. Los microRNAs como mecanismo de regulación de la espermatogénesis y de la maduración del espermatozoide.

El desarrollo de la espermatogénesis implica eventos complejos de proliferación, diferenciación e interacción celular. Por ello, la espermatogénesis requiere un control coordinado de la expresión génica, que incluye diferentes mecanismos de modulación post transcripcional[19, 204, 205] . Los descubrimientos recientes sobre el rol de los RNAs pequeños no codificantes (scRNAs), han revolucionado el conocimiento científico respecto a la regulación génica post- transcripcional. Una clase de scRNAs son los miRNAs, que son cadenas simples de 19-25 nucleótidos de RNA endógeno no codificante, muy conservado entre las especies[206, 207]. La función de los miRNAs se ejerce mediante su unión por complementariedad a una secuencia de mRNA blanco, reprimiéndolo funcionalmente[206-208]. La biogénesis de los miRNAs es muy estudiada (Figura 6). En ese sentido, la información indica la existencia de una vía canónica, donde los miRNAs se sintetizan a partir del DNA a una forma inmadura llamada Pri-microRNA (Pri-miRNA). Luego, en una segunda fase, el complejo enzimático formado por la ribonucleasa *Drosha* y la proteína de unión *Dgcr8* originan los miRNAs precursores (Pre-miRNAs), que son exportados del núcleo al citoplasma para terminar su maduración mediada por la ribonucleasa *Dicer*[209-211]. Por otro lado, las vías no-canónicas para la síntesis de miRNAs, son independientes de la acción de *Drosha* o *Dicer*[209-211]. Posteriormente, los miRNAs maduros se unen a proteínas de la familia de las Argonautas, formando un complejo de silenciamiento de RNAs (RISC). RISC cumple su función mediante su unión al 3'UTR de los mRNAs blancos y así pueden promover su degradación, interferir en la formación de las subunidades del ribosoma o bien de-adenilar la cola poli-A de los mRNAs[212, 213].



La interferencia del RNA mediada por miRNAs es un importante mecanismo modulador asociado a diferenciación celular y a patologías, que incluyen infertilidad y cáncer testicular[214-218]. Varias investigaciones señalan que existen niveles y tipos específicos de miRNAs en órganos y tejidos del aparato reproductor masculino, cuyo patrón se altera en condiciones patológicas[219, 220]. En relación con el desarrollo testicular, hay un grupo determinado de miRNAs presente en las diferentes etapas de este proceso[220-222]. En cuanto a la relevancia de los miRNAs en la espermatogénesis, cabe mencionar que, los ratones KO para *Drosha* o *Dicer* en diferentes estadios del desarrollo de las células germinales o en las células de Sertoli, son infértiles por graves alteraciones de este proceso [223-225]. Por lo

tanto, los miRNAs son necesarios para la formación de un espermatozoide con capacidad de fecundar como producto de la espermatogénesis[226-228].

Por otra parte, luego que el espermatozoide deja los testículos y se almacena en el epidídimo, aún en aparato reproductor masculino, experimenta fases sucesivas de maduración necesarias para fecundación[229, 230]. En esta instancia se modifican las proteínas y los lípidos, como el colesterol, que componen la superficie y membrana del espermatozoide para favorecer el inicio de la motilidad, la unión y penetración del ovocito[231-233]. Actualmente se propone que los epididismos, participan en la transformación molecular del espermatozoide en el epidídimo[234-236]. Los epididismos son pequeñas vesículas extracelulares, que contienen proteínas de membrana y miRNAs que son transferidos al espermatozoide[237, 238]. Igualmente, estos estudios proponen que las diferentes porciones anatómicas del epidídimo presentan niveles de miRNAs específicos que modulan la expresión génica[239, 240]. Además, en relación a la importancia de la señalización mediada por E₂ en el epidídimo, existen estudios que señalan que los niveles de E₂ en los fluidos del epidídimo son altos, que la enzima responsable de su producción, la *Cyp19a1* está presente en espermatozoides y en células epiteliales del epidídimo y que *Era* se encuentra en diferentes porciones del epidídimo[241, 242]. Otras investigaciones muestran que E₂ está implicado en la contractibilidad de la musculatura lisa epididimal, en la mantención del pH y la osmolaridad de los fluidos del epidídimo[243-245]. Por ello, un desbalance de los miRNAs que existen en el epidídimo que modulan los niveles o la acción de estradiol puede causar infertilidad, lo que se refleja en que los ratones KO condicionales para *Dicer* en el epidídimo presentan una disminución en los niveles de mensajero que codifican para *Era* y *Erβ* y son infértiles[246-248].

4.6. Desregulación de microRNAs implicados en la esteroidogénesis mediada por DEs.

Como ya se ha mencionado, en términos generales, los DEs alteran el sistema endocrino compitiendo con las hormonas esteroidales endógenas, la unión a sus receptores, a las proteínas transportadoras de hormonas y/o alterando el metabolismo o síntesis de hormonas endógenas. De igual manera se ha observado que los DEs, pueden alterar la expresión génica como uno de los mecanismos moleculares de disrupción endocrina[249, 250]. En relación a ello, en los últimos años, los miRNAs han sido ampliamente reconocidos como mediadores clave en el control epigenético de expresión génica, ya que actúan post transcripcionalmente para suprimir la expresión génica a través de la unión complementaria al mRNA, generalmente a regiones sin traducir[251, 252].

Estudios recientes reportan la alteración en niveles de miRNAs inducido por DEs en diversos tipos de células y tejidos[11, 253, 254]. En ese sentido, la desregulación de niveles de miRNAs como un nuevo efecto de DEs, puede ser causada por interacciones agonistas o antagonistas con los receptores de hormonas que a su vez modulan la biogénesis y expresión de miRNAs [255-257]. Adicionalmente, la información muestra que en condiciones que generan daño del DNA y activan a la proteína p53, esta se une directamente a *Drosha* e inicia la biogénesis de miRNAs[253, 258-260]. Por otro lado, estudios recientes indican que la maquinaria canónica de biosíntesis de miRNAs que implica a *Drosha* y *Dicer* puede ser desregulada, modificando la expresión de sus transcritos por la exposición a un DEs, a xenobióticos o por tóxicos medio ambientales, repercutiendo en la biosíntesis de miRNAs[12, 261]. En relación a la interacción de DEs con los receptores de estrógeno, los estudios indican que los DEs pueden unirse a receptores de estrógeno *Era* y *Erb* o activar receptores alternativos como los receptores

acoplados a proteínas G, *Gpcr30*, o el receptor relacionado con estrógenos (*Erry*) para activar la señalización a través de quinasas río abajo. El BPA, el diclorodifeniltricloroetano, los bifenilos policlorados y los ftalatos son sustancias tóxicas importantes que interfieren con las vías normales de estrógenos / andrógenos que conducen a la infertilidad en ambos sexos de muchas formas, incluido el daño del DNA en los espermatozoides, la alteración del patrón de expresión y modificaciones de miRNAs y las modificaciones de histonas[262, 263]. Específicamente en cuanto a la relación que existe entre la exposición a ftalatos y alquilfenoles y desregulación de miRNAs, dos estudios que señalan que células TM4 y células GC-1 tratadas con NP muestran desregulación de miRNAs induciendo apoptosis y otra investigación que indica que ratas tratadas durante la vida intrauterina y adulta con MEHP, un metabolito de DEHP, muestran alteración de miRNAs en el tejido testicular similar a algunos de los miRNAs desregulados en espermatozoides de hombres infértiles[264, 265]. Por otro lado, la sobre expresión de miRNAs en células de la granulosa humana altera la producción de hormonas esteroidales, sugiriendo que la desregulación de miRNAs específicos afectan la esteroidogénesis en células sensibles a hormonas[266, 267]. En relación a lo anterior y al contenido de esta investigación, existen estudios que validan que miRNAs presentes en el testículo y en espermatozoides, como mir let 7f y mir 92, tienen como blanco a *Cyp19a1* y al *Erβ*, respectivamente[268, 269]. Por último, existe solamente un trabajo que señala que miRNAs desregulados en espermatozoides de hombres con infertilidad idiopática, tienen como blanco a *Cyp19a1*, *Hsd17β1*, *Era* y a otros genes implicados en su regulación, en diferentes tipos celulares[269-273]. Lo anterior sugiere que el espermatozoide refleja alteraciones en los procesos implicados en su generación y puede ser un biomarcador de estos procesos.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición a la mezcla de DEs puede ser la causa de infertilidad masculina idiopática (sin causa conocida). Los DEs pueden ejercer una acción aguda o crónica en el tracto genital masculino, femenino o durante la fecundación desregulando vías de señalización implicadas en la maduración final del espermatozoide indispensables para la fecundación, como la capacitación y la RA. Además, los DEs pueden impactar la fertilidad masculina de una manera crónica, alterando el balance testosterona / E₂, el contenido de RNA de los espermatozoides y por tanto impactando la capacidad funcional del espermatozoide durante la fecundación (Figura 7). Dado este problema, nos planteamos estudiar el mecanismo molecular subyacente al efecto de DEs en humanos, mediante un modelo “*in vitro*” de efecto agudo, para investigar los posibles efectos de la presencia de DEs en el tracto genital femenino y sus posibles efectos en parámetros funcionales del espermatozoide que son importantes para lograr la fecundación. Además, estudiamos, en un modelo “*in vivo*” murino, la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquilfenoles y su impacto en la producción de espermatozoides y su contenido de RNA. Para efectos de esta tesis se han planteado dos hipótesis, las que se presentan a continuación. Igualmente se denominará efecto agudo para el objetivo que emplea el modelo de exposición aguda” *in vitro*” y efecto crónico para el objetivo que emplea el modelo de exposición crónica” *in vivo*”.

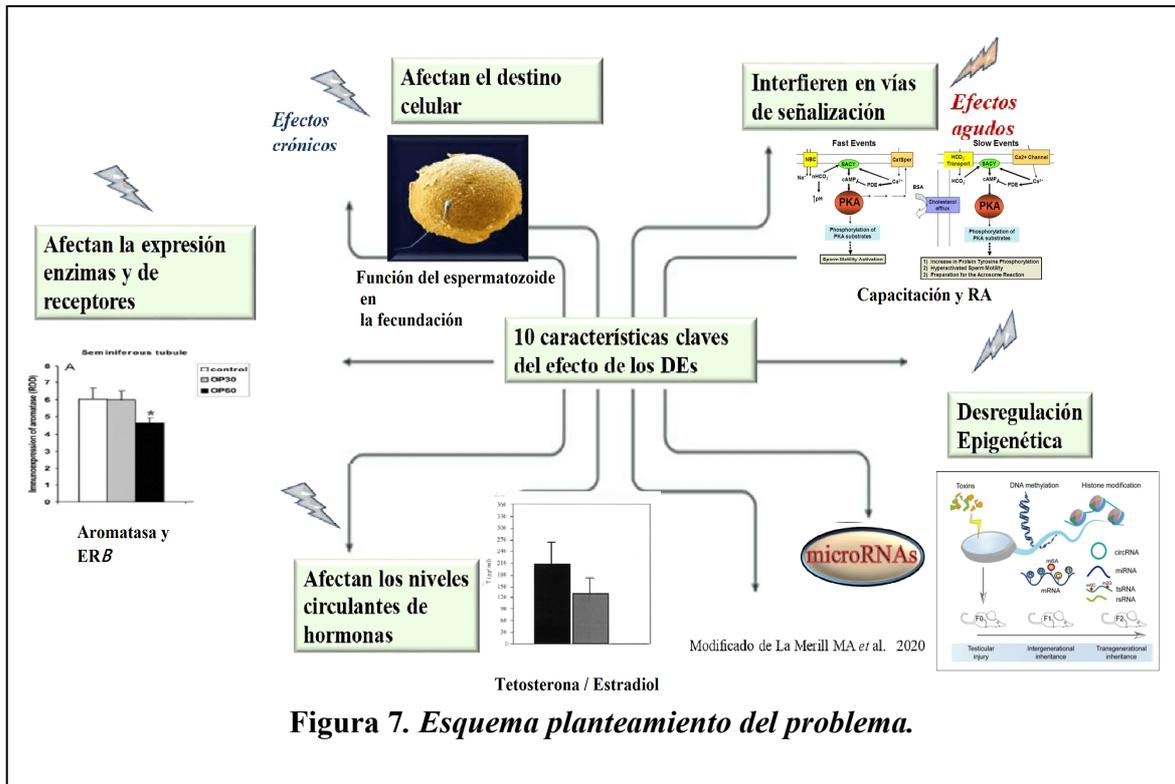


Figura 7. Esquema planteamiento del problema.

6. HIPÓTESIS

6.1. Hipótesis N°1: “La exposición aguda a NP y DEHP a espermatozoides de ratón afecta su capacidad fecundante”.

6.2. Objetivo General N°1.

Evaluar si se modifican parámetros funcionales en espermatozoides de ratón expuestos en forma aguda a concentraciones fisiológicamente relevantes de NP y DEHP.

6.3. Objetivos Específicos del Objetivo General N°1.

6.3.1. Determinar si NP y DEHP inducen la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón

6.3.2. Evaluar si NP modula la capacitación alterando la fosforilación de sustratos en Ser/Thr, fosforilación de sustratos en Tyr y la activación de PKA.

6.4. Hipótesis N°2: “La exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquilfenoles modifica la capacidad de fecundación, el perfil de RNA y los niveles de expresión de la enzima aromatasa (*Cyp19a1*) y del receptor nuclear de estrógeno *Erβ*, vía la desregulación de los microRNAs que los modulan, en espermatozoides de ratón”.

6.5. Objetivo General N°2.

Investigar si la administración crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles modifica la capacidad de fecundación, el perfil de RNA, los niveles de expresión de la enzima aromatasa (*Cyp19a1*) y del receptor nuclear de estrógeno *Erβ*, vía la desregulación de los microRNAs que los modulan, en espermatozoides de ratón.

6.6. Objetivos Específicos del Objetivo General N°2.

- 6.6.1. Determinar el efecto crónico como disruptor endocrino, de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles en ratones macho.
- 6.6.2. Determinar si la exposición crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles a ratones macho afecta la capacidad de fecundación de los espermatozoides.
- 6.6.3. Determinar si la exposición crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles a ratones macho modifica los niveles y perfil del RNA de los espermatozoides.
- 6.6.4. Determinar si la exposición crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles a ratones macho modifica, en los espermatozoides, los niveles de expresión de *Cyp19a1*, *Erβ* y de los miRNAs que los modulan.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL OBJETIVOS GENERALES N°1 Y N°2.

7.1. Diseño Experimental Objetivo General N°1 (Modelo de exposición aguda con espermatozoides de ratón “*in vitro*”).

Para investigar este objetivo se evaluaron diferentes procesos que ocurren durante la capacitación, clasificados como eventos tempranos (activación de PKA, fosforilación de proteínas en residuos de Ser/Thr) o eventos tardíos (fosforilación de proteínas en residuos de Tyr y RA), espermatozoides en condiciones no capacitantes y capacitantes, en condiciones control o con los DEs empleados en estos experimentos (NP y DEHP) (Figura 8).

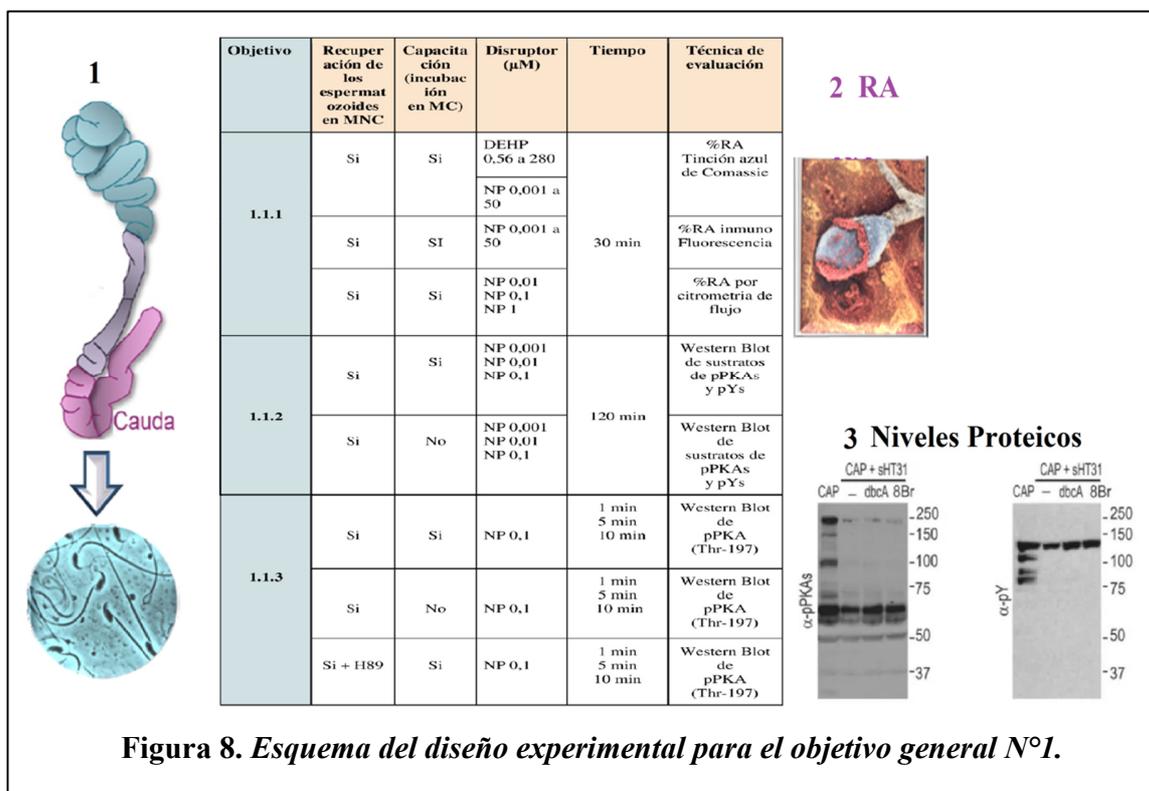


Figura 8. Esquema del diseño experimental para el objetivo general N°1.

A) Se muestra un esquema del epidídimo con sus diferentes secciones. Los espermatozoides maduros se obtuvieron de la cola del epidídimo.

B) En la tabla se muestra el objetivo respectivo, en la segunda columna las condiciones de incubación (MC: tipo de medio de incubación), En la tercera columna el tipo y concentración de DE y por último la técnica se utilizó para la evaluación. Los números muestran las etapas secuenciales de los experimentos.

7.2. Diseño experimental por cada objetivo específico.

7.2.1. Determinar si NP y DEHP inducen la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón.

Para investigar este objetivo, los espermatozoides maduros de ratón y los espermatozoides maduros de ratón que expresan EGFP en el acrosoma y DsRed2 en las mitocondrias, recuperados de la cola del epidídimo, se incubaron durante 30, 90 o 120 min en medio capacitante (MC) más vehículo, en Medio no capacitante (MNC) más vehículo o en MC o MNC más concentraciones crecientes de DEHP y NP o sólo de NP. La RA se evaluó mediante la tinción de azul de *Coomassie*, citometría de flujo para EGFP la epifluorescencia del colorante LysoTracker. Como control de la máxima respuesta de RA se usó el ionóforo de Ca^{+2} A23087 o P4.

7.2.2. Evaluar si NP modula la capacitación alterando la fosforilación de sustratos en Ser/Thr, fosforilación de sustratos en Tyr y la activación de PKA.

Para investigar este objetivo diseñamos experimentos donde extrajimos los espermatozoides maduros de la cola del epidídimo que se incubaron en MC o MNC durante 120 min, en presencia de diferentes concentraciones de NP. La fosforilación de los sustratos de PKA o la fosforilación de los sustratos de Tyr se evaluó mediante *Western Blot* con los anticuerpos anti-sustratos de PKA (pPKAs) y anti-sustratos de Tirosina Quinasa (pYs). Por otro lado, para investigar la activación de PKA, los espermatozoides maduros se incubaron en MC o MNC durante 1, 5 o 15 min en presencia o ausencia de 0,1 μ M de NP o se extrajeron en MNC + un inhibidor potente y selectivo de PKA, 10 μ M de H89. En todos los experimentos, la fosforilación en Thr197 (un residuo que está involucrado en la activación de PKA) de la subunidad catalítica α de PKA, fue detectada mediante el anticuerpo específico para ello.[274, 275].

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Animales.

Se utilizaron ratones macho adultos de la cepa BalbC (10-12 semanas) y ratones machos *knock in* de doble gen [BDF1-Tg (CAG-mtDsRed2, Acr-EGFP) RBGS0020sb], que expresan EGFP en el acrosoma y Ds-Red2 en las mitocondrias de la pieza media flagelar. Los ratones se mantuvieron a 23 °C con 12 h de luz: 12 h de ciclo de oscuridad. Los procedimientos de experimentación animal fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética del IBYME y de acuerdo con las normas establecidas por el Consorcio para el Desarrollo de una Guía para el Cuidado y Uso de Animales Agrícolas en la Investigación y Docencia Agrícola y por el Consejo Nacional de Investigaciones. Todos los protocolos animales fueron avalados por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología de Chile (FONDECYT).

8.2. Capacitación espermática “*in vitro*”.

Se recuperaron espermatozoides de la cola del epidídimo de ratón en medio no capacitante (MNC), que es un medio de *Whittingam* modificado que contenía NaCl 99,2 mM, KCl 2,69 mM, MgCl₂ 0,5 mM, Na₂HPO₄ 0,314 mM, CaCl₂ 1,79 mM, lactato de sodio 21,5 mM, piruvato de sodio 0,5 mM, Glucosa 5,5 mM, 0,063 mg / ml de penicilina g sódica, 0,050 mg / ml de estreptomicina más Hepes 10 mM y NaCl 115 mM[276]. La concentración final de espermatozoides se determinó utilizando una cámara de Neubauer. Se diluyeron alícuotas de

la suspensión original para alcanzar $2-5 \times 10^6$ células / ml en 0,5 ml de medio capacitante fresco (MC) que es el medio de *Whittingam* modificado más NaHCO_3 25 mM y BSA(albúmina de suero de bovino) al 3% [277]. Los espermatozoides se incubaron hasta 120 min a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 en el aire.

8.3. Evaluación de la Reacción Acrosómica por tinción con azul brillante de Coomassie (CBB).

Luego de realizar los experimentos, los espermatozoides se fijaron en 1 volumen de paraformaldehído al 4% recién preparado en tampón fosfato salino (PBS 1X) que contenía NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 3 mM, pH 7,4, durante 1 h a 48 °C, se lavaron con acetato de amonio 0,1 M (pH 9) mediante centrifugación a temperatura ambiente a 3000 g durante 10 min, se montaron en portaobjetos y que se secaron al aire. Los portaobjetos se lavaron mediante inmersiones sucesivas en agua, metanol y agua (5 min cada una) y luego se incubaron en solución de CBB (CBB al 0,22% en metanol al 50% y ácido acético al 10%) durante 2 min. Después de la tinción, los portaobjetos se lavaron minuciosamente con agua destilada, se montaron (Entellan, Merck®, Dermstad, Alemania) y se observaron inmediatamente para evitar la difusión de la mancha. Los espermatozoides se consideraron como "acrosoma intacto" cuando se observó una tinción azul brillante en la región dorsal del acrosoma o como "acrosoma reaccionado" cuando la tinción era irregular o ausente.

8.4. Evaluación la Reacción Acrosómica usando LysoTracker™.

Los espermatozoides vivos se incubaron con 750 nM de LysoTracker™ durante 20 min y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente, alícuotas de los espermatozoides se montaron en portaobjetos con (Fluoromont®, Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.). Se evaluó la integridad del acrosoma bajo un microscopio de epifluorescencia Nikon (Tokio, Japón). Se contaron al menos 200 espermatozoides en 3 experimentos independientes[278].

8.5. Evaluación de la Reacción Acrosómica mediante citometría de flujo.

La Reacción Acrosómica se evaluó por citometría de flujo como se describió anteriormente en Romarowski et al.[279]. Los espermatozoides de ratón Acr-EGFP se incubaron en condiciones de capacitación durante 90 min en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de NP. Después de los 90 min, se añadió progesterona 20 μM o ionóforo de Ca^{+2} A23187 10 μM durante 30 min para estimular la exocitosis acrosómica. Los espermatozoides EGFP se analizaron usando un citómetro de flujo (citómetro de flujo FACSCanto II, BD, San José, CA, EE. UU.) Para evaluar el estado acrosómico después de agregar yoduro de propidio (IP) a la suspensión de espermatozoides para determinar su vitalidad. Se utilizó un filtro de ruta de banda de (515–545) nm y filtros de ruta de 650 nm para GFP e IP, respectivamente.

8.6. Extracción de proteínas del espermatozoide.

Los espermatozoides se recolectaron por centrifugación durante 5 min a 400 g, se lavaron (5 min, 400 g) en 1 ml de PBS, se re suspendieron en tampón de muestra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10% v/v) y se hirvieron durante 5 min. Después de centrifugar durante 5 min a 13.000 g, se añadió β -mercaptoetanol al 5% a los sobrenadantes y se hirvió de nuevo durante 5 min. Se añadió azul de bromofenol a una concentración final del 0,0005% a la mezcla. Los extractos de proteínas equivalentes a $2-5 \times 10^6$ espermatozoides por carril se separaron mediante SDS-PAGE y se sometieron a inmuno transferencia.

8.7. Western Blot.

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en geles que contenían 10% de poliacrilamida según el método de Laemmli, en 1970 y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa[280]. Las membranas se bloquearon en leche en polvo al 5% en PBS que contenía 0,1% de *Tween* 20 (T-PBS) durante 30 min a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el primer anticuerpo y el secundario. Los anticuerpos se diluyeron en leche en polvo al 2% en T-PBS de la siguiente manera: para el anticuerpo primario de ratón monoclonal anti-subunidad C α de PKA de ratón en una concentración final de 0.02 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Santa Cruz Biotechnology, Dallas Texas), anticuerpo para las subunidades catalíticas policlonales de conejo anti-ratón Anticuerpo anti-PKA alfa + beta (fosfo T197) en una concentración final 0.002 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (ABCAM. Cambrigde, MA), anticuerpo monoclonal de ratón anti pYs de ratón (Clon 4G10, Upstate Biotechnology Lake

Placid, NY) en una concentración final de 0,2 µg/ml, para el anticuerpo policlonal de conejo anti-sustratos Ser/Thr de PKA dilución de 1:3000, y para el anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-tubulina de ratón dilución de 1:5000 (Sigma-Aldich, St Louis, MO. EE.UU.). Los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano se diluyeron en leche en polvo al 2% en T-PBS de la siguiente manera: para el anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra (0,0033 µg/ml) (Vector, Burlingame, CA. EE. UU.) y para el anticuerpo secundario IgG anti-ratón de caballo (0,0033 µg/ml) (Cell Signalling. Danvers, MA. EE. UU.). En todos los casos, las bandas reactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia mejorada (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.).

9. DISEÑO EXPERIMENTAL OBJETIVO GENERAL N°2 (Modelo de exposición crónica murina “*in vivo*”).

Con el objetivo de reproducir en un modelo animal la exposición humana crónica a DEs de uso habitual, seleccionamos DEHP, DBP, BBP, NP y OP ya que son los principales DEs que componen los plásticos y detergentes, que se encuentran en utensilios de uso común, en el ambiente y en fluidos de humanos, en una razón 9:1 para ftalatos y alquilfenoles, respectivamente[281, 282]. Las dosis fueron escogidas basadas en la exposición no ocupacional y ocupacional a estos compuestos. Dado lo anterior, la dosis de 1 mg/Kg/d, representa la exposición no ocupacional y está bajo la dosis de riesgo mínima que puede causar efectos adversos en el desarrollo y la reproducción humana, mientras que la dosis de 10 mg/Kg/d está basada en los valores de referencia cercanos a la exposición ocupacional, si se considera que la exposición a estos compuestos se encuentra entre los rangos de 0,3 mg/Kg/d y 143 mg/Kg/d[283-286]. Además, cabe señalar que estas dosis son 1000 y 100 veces menor, en relación al nivel más bajo de efecto adverso observado (LOAEL) de DEHP y NP, 1000 y 100, respectivamente, para efectos adversos endocrino-reproductivos en humanos, ratas y ratones[287, 288].

Empleamos una solución madre que contenía tres ftalatos (DEHP, DBP y BBP) diluidos en DMSO y dos alquilfenoles (NP y OP) diluidos en etanol, los que componían la mezcla final. Las dosis fueron preparadas diariamente y se administraron en el agua para beber cada dos días, de acuerdo con el peso corporal del animal. Durante todo el período experimental, las botellas fueron cubiertas con papel de aluminio para evitar la fotólisis de los compuestos.

Tanto para el vehículo como para los tratamientos, las dosis finales de DMSO y de etanol fueron de 2,5 g /Kg/d y 0,06 g/Kg/d. Cabe mencionar que en ratones se han establecido dosis tolerables en 7,9 g /Kg/d para DMSO y 2,5 g /Kg/d de etanol, por vía oral [289]. Para realizar una aproximación “*in vivo*” a la exposición humana crónica a un entorno con mezclas de DEs, administramos la mezcla de DEs o vehículos (control) a ratonas preñadas a partir de 0,5 días después del coito (n biológico) la que continuó durante el embarazo y la lactancia. Al destete, solo los machos fueron seleccionados y mantenidos en un grupo de tres a cuatro individuos por jaula. Continuamos la administración de la mezcla de DEs o control hasta la edad adulta (75 días de vida, Figura 9). A continuación, se muestra un esquema de la administración crónica de ftalatos y alquilfenoles (Figura 9), una tabla de los tratamientos empleados en este estudio (Tabla 1) y un esquema del diseño experimental (Figura 10).

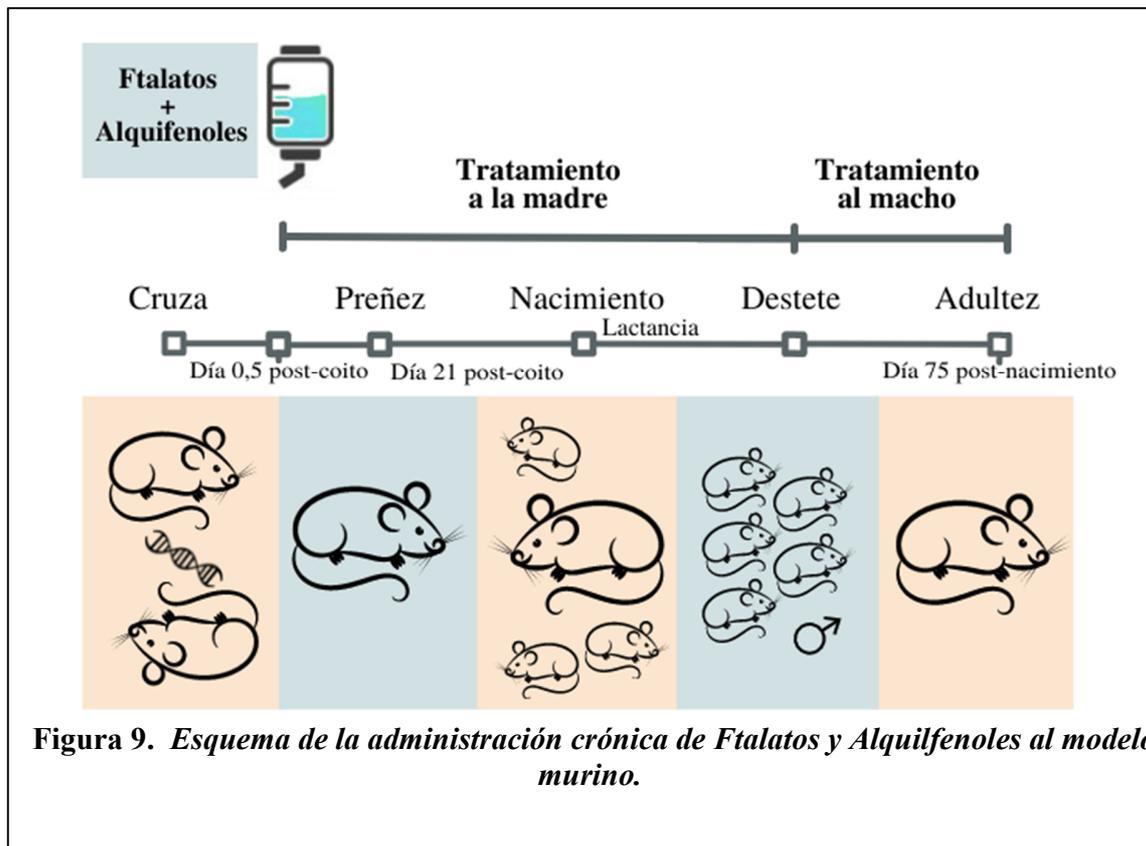
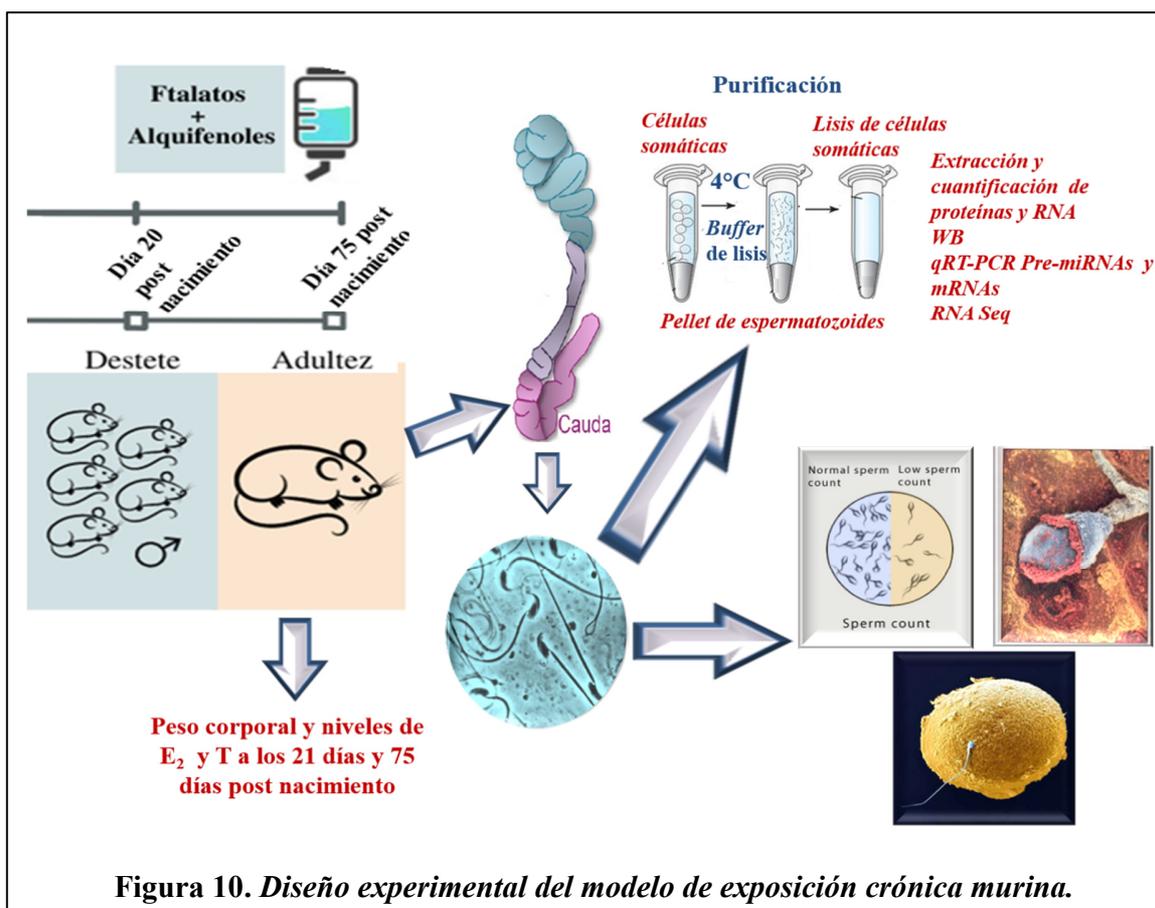


Tabla 1: Descripción de tratamientos con ftalatos y alquilfenoles. Se indica la dosis LOAEL para cada uno de ellos.

Grupos DE	B Dosis 0,1X	C Dosis 0,001X	D Vehículo	LOAEL
DEHP	3 mg/Kg/d	0,3 mg/Kg/d	DMSO	300 mg/Kg/d
DBP	3 mg/Kg/d	0,3 mg/Kg/d	DMSO	100 mg/Kg/d
BBP	3 mg/Kg/d	0,3 mg/Kg/d	DMSO	200 mg/Kg/d
NP	0,5 mg/Kg/d	0,05 mg/Kg/d	Etanol	43-64 mg/Kg/d
OP	0,5 mg/Kg/d	0,05 mg/Kg/d	Etanol	150 mg/Kg/d
Dosis Total	10 mg/Kg/d	1 mg/Kg/d	--	850 mg/Kg/d



9.1. Diseño experimental por cada objetivo específico.

9.1.1. Determinar el efecto crónico como disruptor endocrino, de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles en ratones macho.

9.1.2. Determinar si la exposición crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles a ratones macho afecta la capacidad de fecundación de los espermatozoides.

Como este trabajo considera la administración a la madre de la mezcla de DEs desde la concepción, lo primero fue determinar parámetros como duración de la preñez y tamaño de la camada, efectos tóxicos que fueron descartados en una investigación paralela en nuestro laboratorio, en relación a efectos reproductivos en las hembras expuestas[12, 13]. Basados en esa información previa, en este trabajo usamos como parámetros de toxicidad la evaluación del estado general de los ratones y su peso corporal, que no solo refleja el grado de toxicidad de la mezcla, sino que también, múltiples estudios señalan el desbalance de las vías de señalización implicadas en la regulación del peso corporal y de la homeostasis de los lípidos, como un relevante efecto disruptor de estos compuestos[290-292]. Para determinar el efecto de la mezcla en un parámetro tan sensible como el peso corporal en dos diferentes etapas del desarrollo, analizamos estadísticamente, el peso de los machos al destete (21 días de vida) y en la adultez (75 días de vida). Por otra parte, dado que debíamos evaluar si nuestra mezcla efectivamente tenía un efecto disruptor específicamente en la salud reproductiva masculina y que existe literatura que indica que ftalatos y alquilfenoles generan una alteración en el balance de las hormonas que regulan la espermatogénesis y la función del

espermatozoide, evaluamos los niveles plasmáticos de las principales hormonas implicadas en estos procesos biológicos, testosterona y E₂ y también, determinamos el balance entre ambas hormonas a nivel plasmático, en ratones adultos expuestos y ratones adultos control[253, 293-295]. Por otro lado, para investigar más específicamente el efecto disruptor de la exposición crónica a la mezcla sobre la capacidad de fecundación de los espermatozoides, determinamos parámetros tales como: concentración de espermatozoides en el líquido seminal, capacidad de experimentar la RA “*in vitro*” y tasa de fecundación “*in vitro*” (FIV), de espermatozoides de ratones adultos expuestos y ratones adultos control[296-301].

9.1.3. Determinar si la exposición crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles a ratones macho modifica los niveles y perfil del RNA de los espermatozoides.

9.1.4. Determinar si la exposición crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles a ratones macho modifica, en los espermatozoides, los niveles de expresión de *Cyp19a1*, *Erb* y de los miRNAs que los modulan

De acuerdo a lo descrito, la exposición durante la vida a DEs con efectos antiandrogénicos y/o esteroideogénicos, induce alteraciones intergeneracionales y transgeneracionales en diferentes sistemas del organismo, incluyendo el sistema reproductivo de ambos sexos [302-304]. En relación con lo anterior, uno de los mecanismos moleculares en estudio actualmente que ha adquirido relevancia, es el mediado por miRNAs en la modulación génica post

transcripcional, sobre todo en el aparato reproductivo masculino y femenino. De igual manera, los estudios sugieren que existe una la relación entre la exposición a DEs y la desregulación de miRNAs, y que también hay una relación entre la desregulación de miRNAs y de sus transcritos, como muestran estudios de nuestro propio laboratorio, realizados en testículos, ovarios y aparato reproductor de ratones machos y hembras[11-13, 253] . En cuanto a los efectos similares en espermatozoides, en un estudio del 2019, se encontró evidencia de que ratones tratados con DEHP muestran alteraciones en el contenido de transcritos de los espermatozoides en asociación con la alteración de parámetros de fertilidad transmitidos a través de varias generaciones[304]. En relación con los resultados ya descritos, a las alteraciones en los niveles de transcritos y miRNAs en espermatozoides de pacientes infértiles y la relevancia que ha adquirido el transcriptoma del espermatozoide, sugieren que esa la transmisión a través de generaciones también puede involucrar RNA desregulado de los espermatozoides. Por ello, investigamos si la mezcla de DEs, en espermatozoides de ratones expuestos modifica el contenido total, el perfil de RNA y la expresión de genes que regulan procesos biológicos. Para esto, extrajimos el RNA de los espermatozoides de ratones expuestos y control y lo sometimos a secuenciación masiva de RNA en un laboratorio de la Universidad Mayor que realiza servicios de análisis genéticos y bioinformáticos (Genoma Mayor SPA. Por otro lado, y en relación con el objetivo 6.6.4 y a lo referido previamente, la espermatogénesis y la maduración del espermatozoide se encuentran regulados a nivel génico y hormonal. En este sentido, se ha observado que los niveles de E₂, y sus receptores (E α y E β), mantienen la espermatogénesis y la maduración del espermatozoide y, por otra parte, los niveles y acción de E₂ pueden ser regulados por agentes externos como los DEs, que a su vez pueden afectar los niveles de miRNAs, modulan los procesos que generan

espermatozoides funcionales. Por todo lo anterior estudiamos los niveles de mRNA y de miRNAs de los espermatozoides de ratones expuestos a las mezclas de ftalatos y alquilfenoles y de ratones control. Los niveles de mRNA de *Cyp19a 1*, *Erβ*, Pre-miRNAs 7b,7d y 7g se determinaron mediante qRT-PCR, como control positivo se empleó Acrosina (*Acr*) y protamina (*Prm*), como control negativo se empleó Panexina1(*Panx1*) y Resistina (*Retn*), como genes endógenos de referencia se emplearon *Gapdh* y β 2 microglobulina (*B2m*) [305, 306] . Los niveles proteicos de CYP19A1 y ER β se determinaron mediante *Western Blot*, como control de carga se empleó β -tubulina.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. Animales.

Las hembras y machos adultos de ratón de la cepa C57BL/6J de 60 días fueron obtenidas del bioterio de la PUC y las que se mantuvieron en jaulas de polisulfonato H-TEMP sin bisfenol A (TECNIPLAST). Los ratones se alojaron en un ambiente controlado en una habitación con un ciclo de luz oscuridad de 12 h:12 h, a 22 ± 1 °C. Los alimentos administrados eran libres de fitoestrógenos y se proporcionó agua para consumo *ad libitum*. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Científico para el Cuidado de los Animales y el Ambiente en la Pontificia Universidad católica de Chile N°141215006. Todos los protocolos animales fueron aprobados por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONDECYT). Los criterios para la determinación de las dosis ya se explicaron previamente y la dosis final se calculó de acuerdo al peso corporal y volumen de agua ingerido por los ratones, información que fue registrada previamente en un estudio piloto que concordó con los datos señalados en la literatura referente a estos parámetros[307, 308]. La ingesta de agua fue controlada cada día. La ingesta total de agua no se afectó por la exposición de los ratones a la mezcla de ftalatos y alquilfenoles o al vehículo. La mezcla de ftalatos y alquilfenoles se preparó diariamente de acuerdo con los cambios en el peso corporal de los animales y se administró en el agua potable durante todo el período experimental. Las botellas se cubrieron con papel de aluminio para evitar la fotólisis de los compuestos. Para emular la exposición humana crónica a una mezcla ambiental de ftalatos y alquilfenoles, administramos la mezcla (1 mg/kg/d o 10

mg/kg/d) a hembras ratón preñadas desde el día 0,5 post-coito (n biológico) durante el embarazo y lactancia como se describe en el esquema del diseño experimental (Figura. 2). Al destete (día 21), solo los machos fueron seleccionados y mantenidos en un grupo de tres a cuatro individuos por jaula. Con ellos continuamos la administración de la mezcla de ftalatos y alquilfenoles o vehículo hasta la edad adulta. Al final del tratamiento, los machos (75 días de edad) fueron sacrificados para la realización de los experimentos planificados.

Tabla 2. Principales sales y reactivos empleados en este objetivo.

Reactivos y Kits comerciales	Casa Comercial - código, país
Ftalato de bis 2-etilhexilo	Sigma 4-8557, USA
Ftalato de dipentilo	Sigma 80154, USA
Ftalato de bencilo y butilo	Sigma 308501, USA
4-Nonilfenol	Sigma-Supelco 44-2873, USA
4-terc-Octilfenol	Sigma-Supelco 4-8557, USA
Dimetilsulfoxido	Sigma D2650, USA
Etanol	Winkler AL0205, Chile
Entellan®	Merck 107960, USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent, 5067-1511, USA
Recombinant DNase I (rDNase I)	Life Technologies, Reino Unido
GoTaq®qPCR and RT-qPCR Szytms	Promega, Chile
E.Z.N.A.® Total RNA Kit I	Omega Bio-tek, R6834, USA
Kit Western lightning chemiluminescence reagent plus	PERkinElmer, Inc, USA
TRIzol	Invitrogen, USA
SuperScript® Reverse Transcriptase	Invitrogen, 18064014, USA
Taq DNA polymerase	Invitrogen 10342020, USA
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega M1701. USA
SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, 1708880, USA
2x SYBR Green Fast qPCR Master Mix	Biotool, Reino Unido
TaqMan® Universal Master Mix II	Thermo-Scientific, 4440040, USA

Tabla 3. Principales soluciones usadas en este objetivo.

Nombre	Composición
PBS	NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM, KH ₂ PO ₄ 1.7 mM, pH 7,4 agua csp
PBS-Tween	NaCl 135 mM, KCl 2.6 mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM, KH ₂ PO ₄ 1.7 mM, 0.1% Tween-20, pH 7.4, agua csp.
PBS-BSA	NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM, KH ₂ PO ₄ 1.7 mM, 1% BSA, pH 7,4, agua csp.
Agua DEPC (dietilpirocarbonato)	0.1 % DEPC (v/v).
Tampón TAE	Tris 1.6 M, acetato sódico 0.8 M, EDTA 40 mM, pH 7.2, agua csp.
Tampón RIPA	NaCl 150 mM, Tris 50 mM, 1 mM NAF, 1% NP40 (v/v), pH 7,4 agua csp.
Coctel inhibidor de Proteasas	(leupeptina, Aprotinina, Peptatina, PMSF)
Inhibidores de Fosfatasas	NaVO ₄ 200 mM, agua csp.
Bis –Acrilamida	30% Acrilamida, 0.8% Bis-acrilamida (p/v)
Tampón Tris-HCl	1.5M pH 6,8 agua csp.
Tampón Tris-HCl	1.5M pH 8,8 agua csp.
Tampón de carga 4X	TrisHCl 1M pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 10%, Azul de bromo fenol 0,2%, DTT 1.2%, β-mercaptoetanol 2% (p/v).
Tampón de corrida de electroforesis de proteínas	Tris 25 mM, glicina 0,2 M, 0.1 % SDS, pH 8,3 (v/v).
Tampón de Transferencia de proteínas	Tris 25 mM, glicina 0,2 M, 0,1 % SDS, 20% metanol, pH 8,3 (v/v).
Solución de Bloqueo para proteínas (PBS-Tween-3% leche)	NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM, KH ₂ PO ₄ 1.7 mM, 0.1% Tween-20, 3% leche descremada, pH 7.4, agua csp.
Solución tampón de equilibrado	50 mM Tris·HCl pH 8.8, 2 % [w/v] SDS; 6 M urea; 30 % [v/v] glycerol
Medio DMEM-F12 (Gibco, life technology)	Cat No: 11320033, 11320074, 11320082
Medio No Capacitante	NaCl 99,2 mM, KCl 2,69 mM, MgCl ₂ 0,5 mM, Na ₂ HPO ₄ 0,314 mM, CaCl ₂ 1,79 mM, lactato de sodio 21,5 mM, piruvato de sodio 0,5 mM, Glucosa 5,5 mM, 0,063 mg /ml de penicilina g sódica, 0,050 mg / ml de estreptomicina más Hepes 10 mM y NaCl 115 mM
Medio Capacitante	NaCl 115 mM, KCl 2,69 mM, MgCl ₂ 0,5 mM, Na ₂ HPO ₄ 0,314 mM, CaCl ₂ 1,79 mM, lactato de sodio 21,5 mM, piruvato de sodio 0,5 mM, Glucosa 5,5 mM, 0,063 mg /ml de penicilina g sódica, 0,050 mg / ml de estreptomicina, NaHCO ₃ 25 mM y BSA al 3%

Tampón de lisis de células somáticas	SDS al 0,1%, Triton X al 0,5% en agua tratada con DEPC
Solución Azul Brillante de <i>Comassie</i>	<i>Comassie Brilliant Blue</i> al 0,22% en metanol al 50% y ácido acético al 10%
Solución de IP	Yoduro de Propidio (IP) 3 μ M, agua csp.

Tabla 4. Principales sistemas operativos y programas usados durante esta tesis doctoral.

Sistema Operativos y Programas
Adobe Photoshop 7.0, USA
Image J, USA
PDQuest Advance 8.0, Bio-Rad USA
Multiexperiment viewer 4.6.0, USA
Cytoscape 3.1, USA
Ingenuity pathway analyze (IPA), Qiagen, USA 01-06
Olympus Fluowiew 1.4, Japón
GraphPad Prims 8, USA
PRINSEQ, USA
STAR, USA
HTseq-count, USA
EdgeR, USA
Cytoscape, USA

Tabla 5. Principales bases de datos y herramientas web, usadas en este objetivo.

Bases de Datos	Dirección web
BLAST (“Basic Local Alingment search Tool”)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
ENSEMBL	http://www.ensembl.org/index.html
FastQC	www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/
IsomiRage	http://cru.genomics.iit.it/Isomirage/
MirBase	http://www.mirbase.org/
MGI-Mouse Genome Informatics	http://www.informatics.jax.org/
miRWalk	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/
Trimgalore	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trimgalore
Net-primer	http://www.premierbiosoft.com/
Pubmed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
TargetScanHuman	http://www.targetscan.org/
Uniprot	http://www.uniprot.org/
Genecards	http://www.genecards.org/
FASTQC	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/j
PRIMER BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
OligoAnalyzer Tool	https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/
miRDB	http://www.mirdb.org
MicroCosm Targets	https://tools4mirs.org/software/mirna_databases/microcosm-targets/
microRNA database	https://www.mirbase.org

Tabla 6. Descripción, secuencia y eficiencia (E) de las parejas de cebadores empleados en este objetivo.

Se detalla en colores si las eficiencias de las parejas de cebadores se determinaron: Negro, durante esta tesis. ND = No determinada. Rojo, determinada previamente en el laboratorio.

Gen	Forward	Reverse	E
<i>Cyp19a1</i>	ATTGGCATGCACGAGAATGG	ATTGGCATGCACGAGAATGG	1.71
<i>Gapdh</i>	GCTGATGCTCCCATGTTTCGTGAT	GTGGTGCAAGAGGCATTGCTGAC	2.1
<i>Acr</i>	ACG TGTGGACCTCATTGAC	GTAGTCCCAGGTGGCTGTGT	1.91
<i>Prm 1</i>	CAAAATTCCACCTGCTCACA	ACGCAGGAGTTTTGATGGAC	2.08
<i>Panx1</i>	GTGGCTGCACAAGTTCTTC	CTCTGCCCCACATTCTCAGT	1.97
<i>Retn</i>	AAGCCATCGACAAGAAGATCAAA	TCCAGCAATTTAAGCCAATGTTC	1.81
<i>Erβ</i>	GGAATCTCTTCCCAGCAGCA	GGGACCACATTTTTGCACTT	1.94
<i>B2m</i>	TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA	CAGTATGTTTCGGCTTCCCATTTC	ND
<i>Pre-mir let7f</i>	GATTGTATAGTTGTGGGGTAGTGA	TCAGGGAAGGCAATAGATTGTA	1.87
<i>Pre-mir let7b</i>	GGGTGAGGTAGTAGGTTGTGTG	CAGGGAAGGCAGTAGGTTGT	1.86
<i>Pre-mir let7a</i>	GGTAGTAGGTTGTATAGTTTTAGGG	TCACCTTAGGAAAGACAGTAGATT	1.84
<i>Pre-mir 7d</i>	AGGAAGAGGTAGTAGGTTGCATAG	TAAGAAAGGCAGGCTTG	2.2
<i>Pre-mir 7g</i>	GGCTGAGGTAGTAGTTGTACAGTT	AGGCAGTGGCCTGTACAGTTA	1.85
<i>Pre-mir 92a</i>	CTTTCTACACAGGTTGGGATCG	CCAAACTCAACAGGCCGG	1.72
<i>Pre-mir 200b</i>	CCGTGGCCATCTTACTGG	TCCGCCGTCATCATTACC	2.02
<i>Pre-mir 30b</i>	ACCAAGTTTTAGTTCATGTAAACA	CAGCTGAAGTAAACATCCACCTC	ND
<i>Pre-mir 122</i>	AGCAGAGCTGTGGAGTGTGA	GCCTAGCAGTAGCTGTTTATGGTGA	1.83
<i>Pre-mir 203</i>	GCTGGGTCCATGGGTTCTTA	GCCGGGTCTAGTGGTCCTA	ND

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en este objetivo.

Anticuerpo Primario	Procedencia	Nº de Catálogo	Tipo/Huésped	Dilución µg/ml
CYP19A1	Abbexa	abx001773	Policlonal/Conejo	0.43
Erβ	Abbexa	abx172293	Monoclonal/Ratón	0,4
β-ACTINA	Abbexa	abx005572	Policlonal/Conejo	0,007
β-TUBULINA	Innovative Research	32-2600	Monoclonal/Ratón	0,1

Anticuerpo Primario	Procedencia	Tipo/Huésped	Uso	Dilución
Anti-ratón-HRP	CPL Biologicals, Inc, USA	-	<i>WB</i>	1 en 5000
Anti-conejo-HRP	CPL Biologicals, Inc, USA	-	<i>WB</i>	1 en 5000

10.2. Niveles plasmáticos de E2 y Testosterona.

Finalizando el tratamiento, los machos (75 días de edad) fueron pesados y anestesiados mediante la administración intraperitoneal de ketamina/xilazina (80 y 8 mg/kg, respectivamente). Luego, se recolectaron muestras de sangre mediante punción cardíaca y posterior a su coagulación se centrifugaron a 2300 g a 4 °C durante 10 minutos para recolectar suero. Finalmente, las muestras se almacenaron a 280 °C hasta su medición. La testosterona y el E₂ plasmático, se midieron por duplicado en el servicio de radioinmunoensayo de la Pontificia Universidad Católica de Chile. La sensibilidad y los coeficientes de variación (CV) intraensayo o interensayo para el ensayo de testosterona, fueron 128 pg / mL y CV, 5,8 y 10,6, respectivamente; y los del ensayo de 17 β -estradiol fueron 34 pg / mL y CV, 8,4 y 14,4, respectivamente.

10.3. Medio de extracción “*in vitro*” de espermatozoide de ratón.

Se recuperaron espermatozoides de la cola del epidídimo de ratón en medio no capacitante (MNC), que es un medio de *Whittingam* modificado[276]. La concentración final de espermatozoides se determinó utilizando una cámara de Neubauer.

10.4. Obtención y preparación de los espermatozoides de ratón.

Después de sacrificar los machos por dislocación cervical, se extrajeron las colas del epidídimo y conductos deferentes, trasladándolos a una cápsula Petri con 300 μ l de MNC, por 15' a 37 °C, permitiendo la salida de los espermatozoides por *swim out*. La concentración final de espermatozoides se determinó utilizando una cámara de Neubauer. Para todos los experimento que implicaron evaluación de la reacción acrosómica o evaluación del porcentaje de FIV, se diluyeron alícuotas de la suspensión original de espermatozoides hasta alcanzar $2-5 \times 10^6$ células / ml en 0,5 ml de medio capacitante fresco (MC) [277]. Por otro lado, en aquellos experimentos en que se requirió extracción de RNA, para obtener una población pura de espermatozoides libre de células somáticas, las muestras extraídas se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron dos veces sucesivas en tampón PBS, posteriormente, se eliminó el sobrenadante. El *pellet* de espermatozoides se trató con tampón de lisis de células somáticas y *shock* térmico (4 °C, 30 min). Posteriormente luego de dos lavados con PBS, el *pellet* de espermatozoides se observó

bajo el microscopio para verificar la eliminación de células somáticas. Finalmente, los espermatozoides se sometieron a los procedimientos de extracción de RNA y de proteína.

10.5. Evaluación de la Reacción Acrosómica por tinción con azul brillante de Coomassie (CBB).

Luego de realizar los experimentos ya señalados, los espermatozoides se fijaron en 1 volumen de paraformaldehído al 4% recién preparado en tampón PBS, durante 1 h a 48 °C, se lavaron con acetato de amonio 0,1 M (pH 9) mediante centrifugación a temperatura ambiente a 3000 g durante 10 min, se montaron en portaobjetos y que se secaron al aire. Los portaobjetos se lavaron mediante inmersiones sucesivas en agua, metanol y agua (5 min cada una) y luego se incubaron en solución de *CBB* durante 2 min. Después de la tinción, los portaobjetos se lavaron minuciosamente con agua destilada, se montaron en Entellan (Merck®, Darmstadt, Alemania) y se observaron inmediatamente para evitar su difusión. Los espermatozoides se consideraron con "acrosoma intacto" cuando se observó una tinción azul brillante en la región dorsal del acrosoma o como "acrosoma reaccionado" cuando la tinción era irregular o ausente.

10.6. Fecundación “*in vitro*”.

Los espermatozoides capacitados (incubados en MC por 120 min) en una concentración de 1×10^6 espermatozoides por pocillo se co-incubaron con los ovocitos contenidos el cúmulo oóforo de hembras de control (hembras de 30 días con fertilidad probada) en una incubadora a 37 °C, 21% O₂ y 5% CO₂, durante 24 h. La tasa de fecundación se evaluó observando bajo el microscopio y calculando el porcentaje de embriones de dos células.

10.7. Determinación de los niveles proteicos de CYP19A1 y ERβ en espermatozoides.

Posterior a la extracción, los *pellets* de espermatozoides se lavaron por centrifugación a 10000 g, una vez en PBS frío, eliminando el sobrenadante y se congelaron a -80 °C con inhibidores de proteasas y fosfatasas. La cantidad de proteínas se estandarizó con una concentración de 1×10^6 espermatozoides. En el caso de la línea celular los *pellets* se re suspendieron en 50 µl de tampón de lisis RIPA y con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se incubaron por 1 h a 4 °C y luego se sonicaron (Branson sonifier 150, Merck®). Los componentes insolubles se removieron por centrifugación a 1,500 g por 10 min. El sobrenadante se aisló y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford, usando como patrón estándar una solución de BSA en diferentes concentraciones (1,34 µg/µl). En cuanto a los espermatozoides, los *pellets* (a 4 °C) se re suspendieron en 20 µl de tampón de carga y se sometieron a un pipeteo suave. En ambos casos, las alícuotas de

proteínas, se cargaron en cada línea de un gel de acrilamida al 10% y se sometieron a electroforesis. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Inmuno-Blot PVDF Membrane, BioRad, Richmond, CA, USA) utilizando un aparato de electrotransferencia. Las membranas se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo y luego se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos para CYP19A1, ER β , en diluciones de 1:1000, 1:2500, respectivamente y como controles de carga β -tubulina y β -Actina en diluciones de 1:1000, 1:5000, respectivamente (Tabla 7). Finalmente, se llevó a cabo una segunda incubación con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante en una solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa se detectó mediante una quimioluminiscencia mejorada (Pierce Biotecnología, Rockford, IL).

10.8. Extracción de RNA y reacción de amplificación por qPCR y PCR para determinar niveles de *Cyp19a1*, *Erb* y Pre-miRNAs en espermatozoides.

Luego de la extracción, la muestra de espermatozoides se sometió al tratamiento descrito previamente con el tampón de lisis de células somáticas. Para la extracción de RNA total de los espermatozoides se empleó el reactivo TRIzol. Una vez aislado, el RNA se trató con 1 μ l (2 U/ μ l) por cada 10 μ g de RNA de rDNaseI.

La concentración e integridad de RNA fue determinada con un Espectrofotómetro Thermo Scientific Nanodrop 2000. El cDNA de los genes y del precursor primario (Pri-miRNA) se sintetizó a partir de 1 μ g de RNA por RT Master Mix y cebadores aleatorios. La qPCR se

realizó utilizando 1 μ M de cebadores y 2XSYBR GreenFast qPCR MasterMix. Los datos de expresión se normalizaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando *Gapdh* y *B2m* como genes endógenos de referencia para mRNAs de espermatozoides[309]. Para corroborar la presencia de RNA puro de espermatozoides y la ausencia de cualquier rastro de DNA potencialmente contaminante, se verificó mediante la realización de (RT-PCR) utilizando el cDNA extraído con Kit de transcripción inversa de alta capacidad seguido de una reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) y una RT-PCR para los controles positivos con partidores para los genes Acrosina (*Acr*) y protamina (*Prm*) y para los controles negativos, que fueron Panexina1(*Panx1*) y Resistina (*Retn*), ausentes en los espermatozoides y presentes en todos los otros tipos celulares potencialmente contaminantes. Las secuencias de cebadores para mRNAs y Pre-miRNAs se diseñaron en base a la literatura, usando los programas provistos por IDT®, Oligo Analyzer y PubMed Nucleotides. Para verificar la presencia de cDNA como control interno se utilizó el método descrito por Livack KJ[310].

10.9. Metodología para la determinación de miRNAs y Pre-miRNAs a estudiar.

Los partidores fueron seleccionados en base a la literatura y analizados de acuerdo con las bases de datos enumeradas en la Tabla 5. Para determinar los miRNAs a estudiar, es decir, cuales miRNAs podrían modular la expresión de *Cyp19a1* y *Erb β* , en espermatozoides, usamos la siguiente metodología:

Se realizó una predicción mediante un análisis bioinformático de los miRNAs específicos que modulan una de las principales enzimas implicadas en la producción de E_2 , *Cyp19a1* y de uno de los receptores implicados su señalización $Er\beta$, en espermatozoides de ratón. Para ello, se utilizaron las bases de datos y/o los programas: TargetScanHuman, miRDB, MicroCosm, microRNA y miRWalk, correlacionando los siguientes 5 criterios:

- a) Los miRNAs presentes en espermatozoides de ratón tienen como blancos predichos o validados los genes en estudio para la producción y señalización de E_2 (*Cyp19a1* y *Er\beta*).
- b) Los miRNAs que según evidencia científica tienen por blanco los genes estudiados en células sensibles a E_2 .
- c) Los miRNAs que están desregulados en espermatozoides de pacientes con infertilidad, según la literatura.
- d) Los miRNAs que son desregulados por DEs, y regulados por E_2 , según la evidencia científica.
- e) Los miRNAs, que, según la evidencia, regulan la síntesis de E_2 , en otros tejidos o líneas celulares.

10.10. Extracción de RNA de espermatozoides y Secuenciación Masiva.

Luego de la extracción, la muestra de espermatozoides se sometió al tratamiento descrito previamente, con el tampón de lisis de células somáticas. El RNA total se extrajo con E.Z.N.A.® Total RNA Kit I, y se sometió a un protocolo de digestión en columna DNAsa. La concentración de RNA fue medida por fluorometría QuantaFluor y el tamaño/distribución del RNA por Agilent 2100. A partir de las seis muestras secuenciadas en este proyecto, con lecturas no pareadas de 36 bases (36 SE), se realizó un análisis de calidad de las secuencias,

se filtraron y eliminaron las secuencias y adaptadores de baja calidad (phred value \geq 25), buscando un preprocesamiento o control de calidad de los datos crudos para mejorar la calidad de las secuencias obtenidas. Se consideraron 4 parámetros de filtrado aplicados con los programas PRINSEQ y trimgalore[311], remoción de restos de adaptadores de secuenciación Illumina (trimgalore), eliminación de las bases de mala calidad en los extremos de las secuencias(prinseqoption-Q25), eliminación de lecturas con un valor phred promedio menor a 18. Los reportes fueron generados con el software FASTQC, tanto para las lecturas brutas (raw reads) como para las lecturas post filtro de calidad. En relación a lo anterior, posterior al filtrado se pudo observar una buena calidad de lecturas. Finalmente las lecturas trimeadas se mapearon con el genoma de *Mus musculus* GRCm38 disponible en Ensembl, empleando el programa STAR[312]. Posteriormente, los mapeos efectivos fueron contados empleando el programa HTseq-count[313] y se realizó el análisis de RNA-Seq a través de programa EdgeR[314].

10.11. Análisis estadístico.

Los valores se representaron como el valor promedio \pm el error estándar. Al comparar más de dos poblaciones se utilizó el t test. Cuando hubo más de una variable se usó Anova de dos vías y post test de Bonferroni o *Dunnnett's*. El análisis se realizó en el software Graphpad Prism 8.

11. RESULTADOS

11.1. Determinar si NP y DEHP inducen la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón.

Muchos tóxicos medio ambientales, tales como los compuestos contenidos en los plásticos, xenoestrógenos y algunos pesticidas, tienen un impacto negativo en la fertilidad actuando como DEs[315]. De igual forma, diferentes estudios han señalado que los DEs pueden regular procesos fisiológicos como el movimiento celular, las vías de señalización o la secreción de proteínas por mecanismos de activación no estrictamente relacionados con sus efectos endocrinos (Ej: RA o fosforilación de proteínas)[316, 317]. En relación a lo anterior, la RA es la exocitosis de la vesícula acrosómica que permite que los espermatozoides atraviesen las diferentes capas que rodean al ovocito, por tanto, es el paso clave y final de una serie de vías de señalización bioquímicas conocidas como capacitación, que deben ser experimentadas por los espermatozoides “*in vivo*” o “*in vitro*” para fecundar el óvulo. Se ha demostrado que los tóxicos ambientales “*in vitro*” modulan el estado de capacitación y los niveles intracelulares de Ca^{+2} en los espermatozoides humanos, lo que sugiere que podrían modular la RA y la fecundación. Por ello, para este objetivo, usamos espermatozoides maduros aislados de la cola del epidídimo e incubados en condiciones capacitantes con distintas concentraciones de NP o DEHP, como se describió anteriormente, la RA se evaluó por medio de la tinción de *CBB*. Los resultados mostraron que en el caso de NP (Figura 11A), la RA aumentó en relación al vehículo (incubado en MNC+ etanol) tanto a concentraciones bajas como, en las dos más altas, pero no en la concentración intermedia. Esta curva sugiere que la acción del NP podría

ser bimodal, pero no se realizaron análisis posteriores para comprobar esta observación. En cuanto al DEHP (Figura 11B), se observó un aumento de la RA ya a los 0,56 mM, que incrementó a los 2,8 mM. A concentraciones mayores, el % de RA inducido por DEHP comenzó a bajar, pero aún fue mayor que el control, hasta llegar a un valor similar al control a los 280 mM. Es importante señalar que las menores concentraciones de DEHP y NPO que indujeron la RA se encuentran en el rango de aquellas encontradas en muestras humanas, por lo que estos resultados son relevantes a la fisiología humana[318-324]. Además, se realizó una segunda aproximación experimental utilizando espermatozoides transgénicos que expresan un segmento de la proteína Acrosina fusionada a la Green Fluorescent Protein (GFP) [685]. Estos espermatozoides presentan solo el acrosoma fluorescente, que se pierde cuando ocurre la RA. Estos ratones ya han sido utilizados previamente en estos ensayos y tienen la ventaja que la RA se puede analizar por citometría de flujo [685]. Los resultados mostraron que los espermatozoides incubados en medio capacitante y con 0,1 μ M de NP experimentaron un aumento significativo de la RA (Figura 11D). Debido a que estos ratones son de un *background* genético (C57BL/6) distinto a los utilizados previamente (Balb-C), no es de sorprender las diferencias en los porcentajes de la RA. Los niveles de la RA inducida por NP fueron menores a aquellos en presencia del ionóforo A23187, el que fue usado como un control positivo para determinar el porcentaje máximo posible de la RA. Como una tercera aproximación experimental utilizamos la sonda fluorescente LysoTracker, la que se acumula en los organelos ácidos, por lo que marca el acrosoma intacto y también a la pieza media donde se localizan las mitocondrias[278, 325]. De esta manera la pérdida de la fluorescencia indica un aumento del pH intra acrosomal, lo que es una etapa previa a la RA. A diferencia de los experimentos anteriores, en este caso incubamos los espermatozoides en condiciones

capacitantes y no capacitantes con $0,1\mu\text{M}$ de NP, en ambas condiciones. Los resultados mostraron que $0,1\mu\text{M}$ NP indujo un aumento significativo en la pérdida de la marca de LysoTracker, a un nivel similar de lo que ocurrió en presencia de $20\mu\text{M}$ P4 en condiciones capacitantes y no capacitantes (Figura 12B).

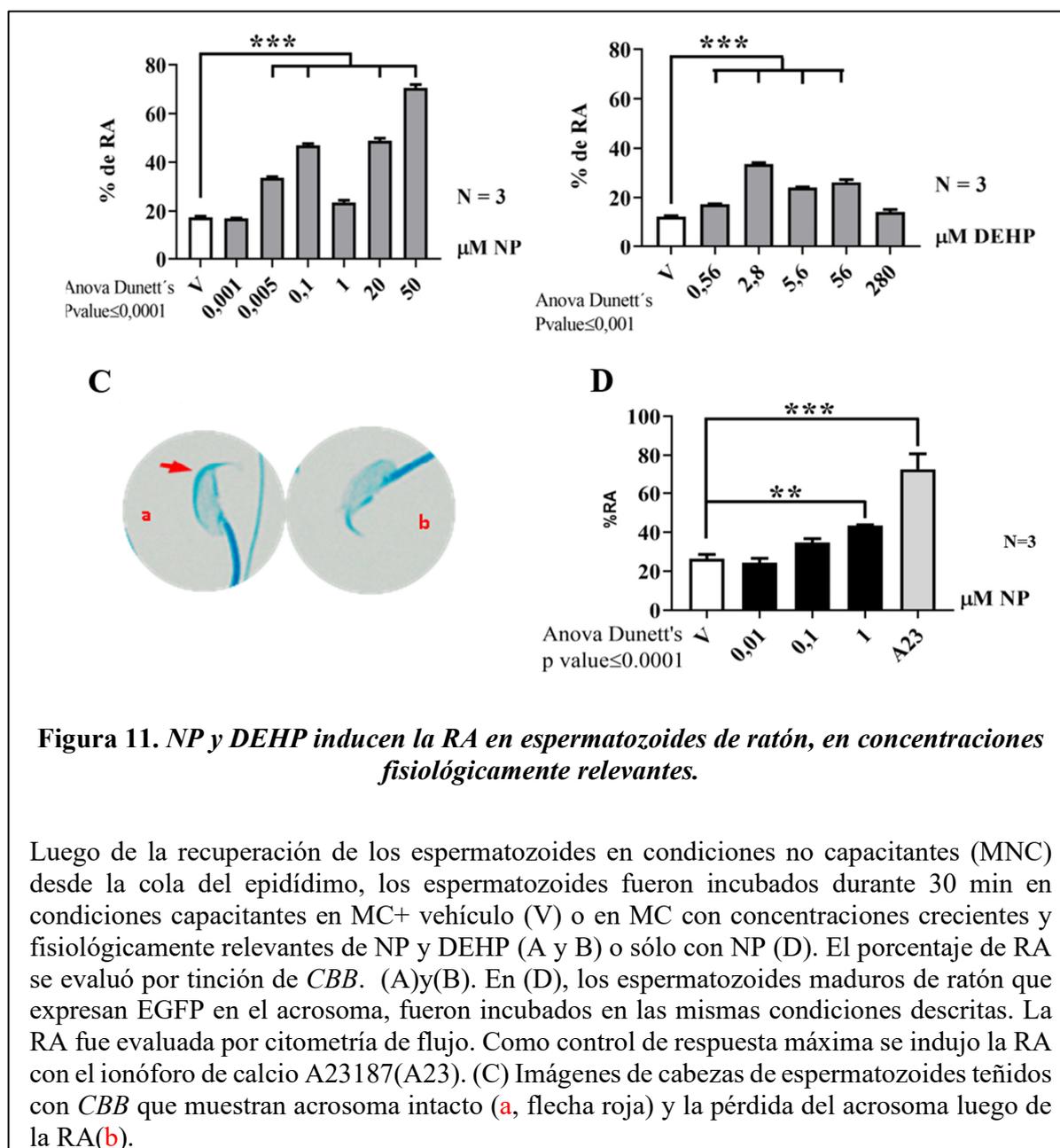
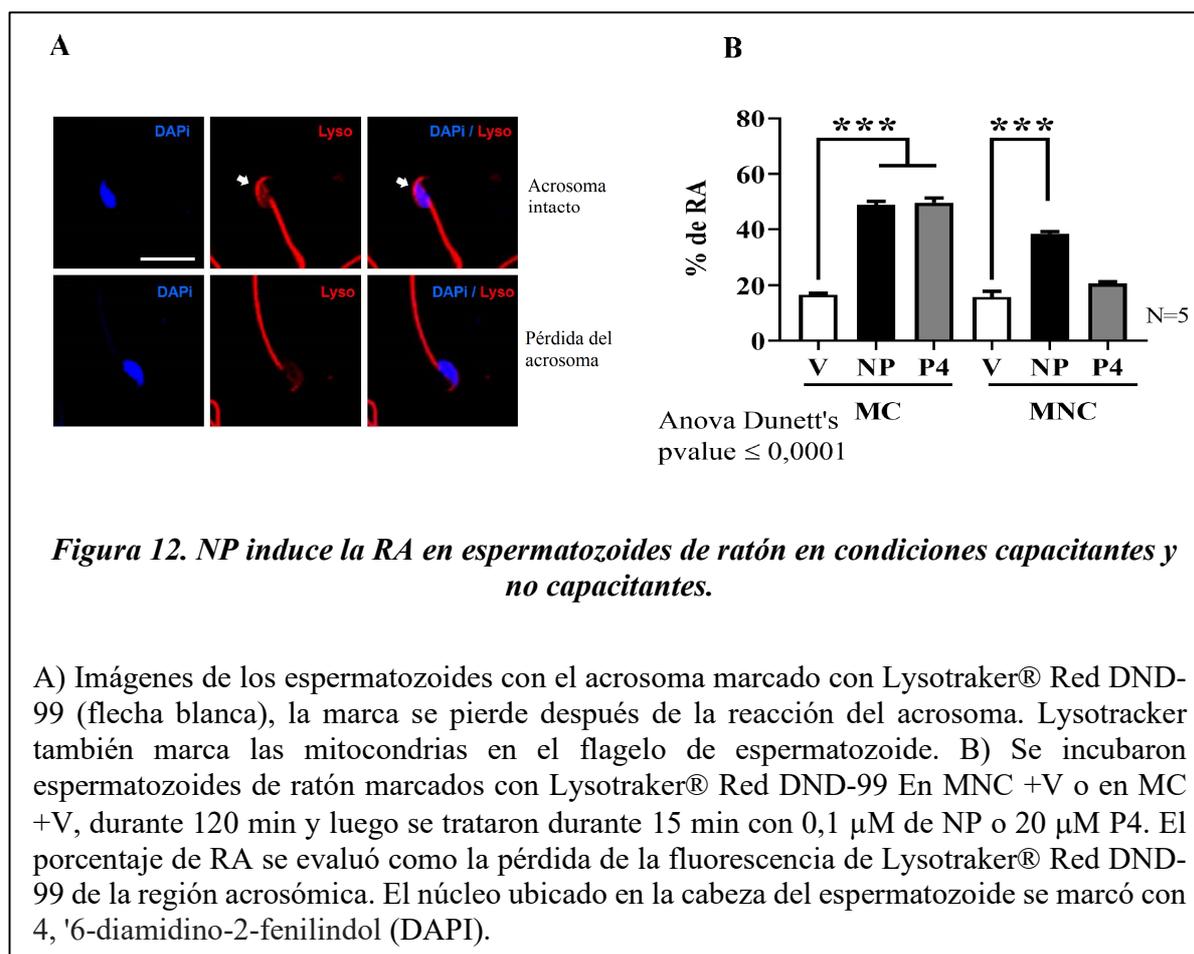


Figura 11. NP y DEHP inducen la RA en espermatozoides de ratón, en concentraciones fisiológicamente relevantes.

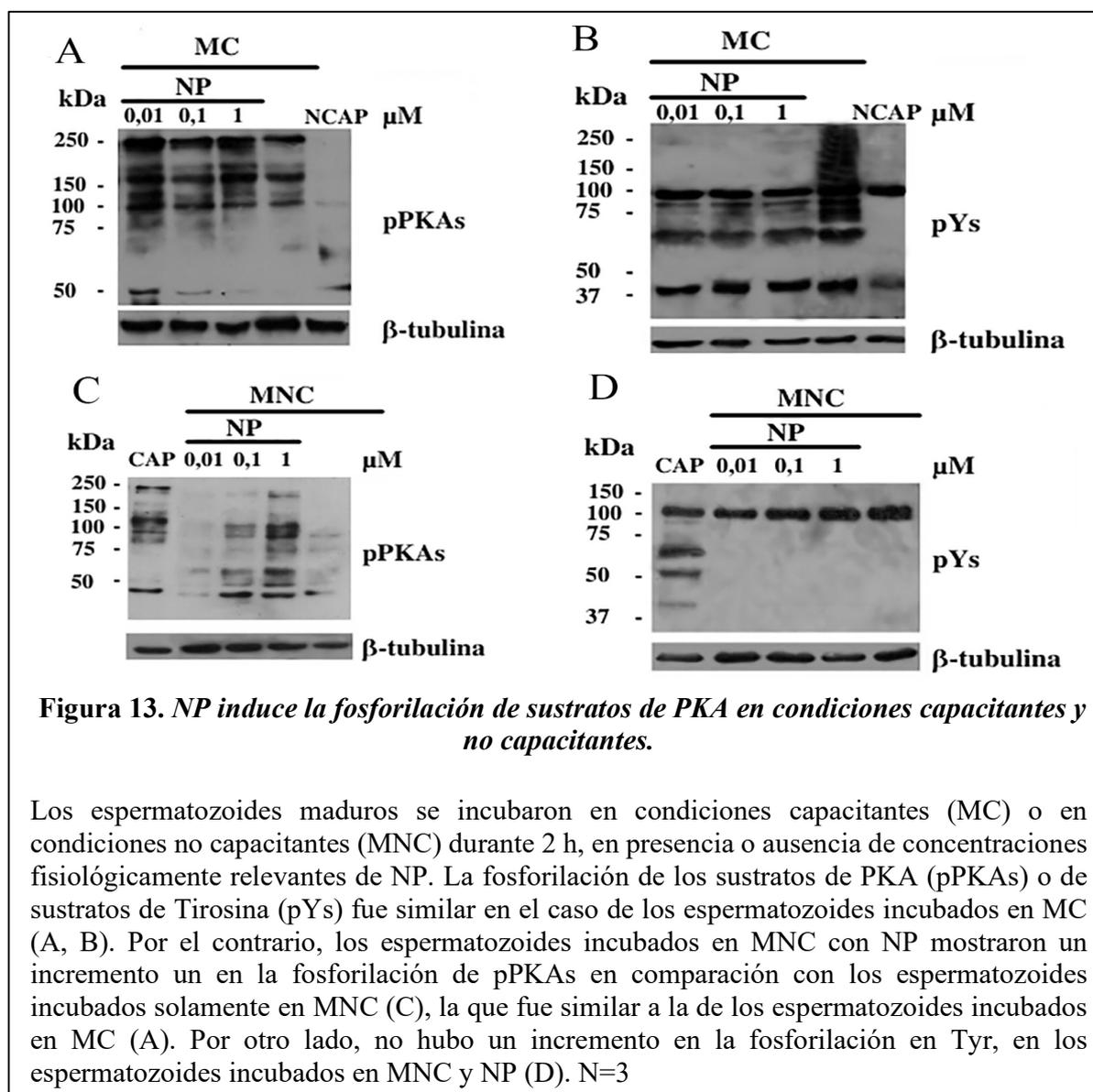
Luego de la recuperación de los espermatozoides en condiciones no capacitantes (MNC) desde la cola del epidídimo, los espermatozoides fueron incubados durante 30 min en condiciones capacitantes en MC+ vehículo (V) o en MC con concentraciones crecientes y fisiológicamente relevantes de NP y DEHP (A y B) o sólo con NP (D). El porcentaje de RA se evaluó por tinción de CBB. (A)y(B). En (D), los espermatozoides maduros de ratón que expresan EGFP en el acrosoma, fueron incubados en las mismas condiciones descritas. La RA fue evaluada por citometría de flujo. Como control de respuesta máxima se indujo la RA con el ionóforo de calcio A23187(A23). (C) Imágenes de cabezas de espermatozoides teñidos con CBB que muestran acrosoma intacto (a, flecha roja) y la pérdida del acrosoma luego de la RA(b).

De manera interesante NP también indujo la RA en espermatozoides en condiciones no capacitantes, a diferencia de lo que ocurrió con P4. Esto sugiere que los mecanismos involucrados entre estos dos compuestos son distintos. Alternativamente, es posible que, dado que LysoTracker es un indicador de pH, NP induzca una alcalinización del acrosoma en el MNC, cosa que no ocurre con P4.



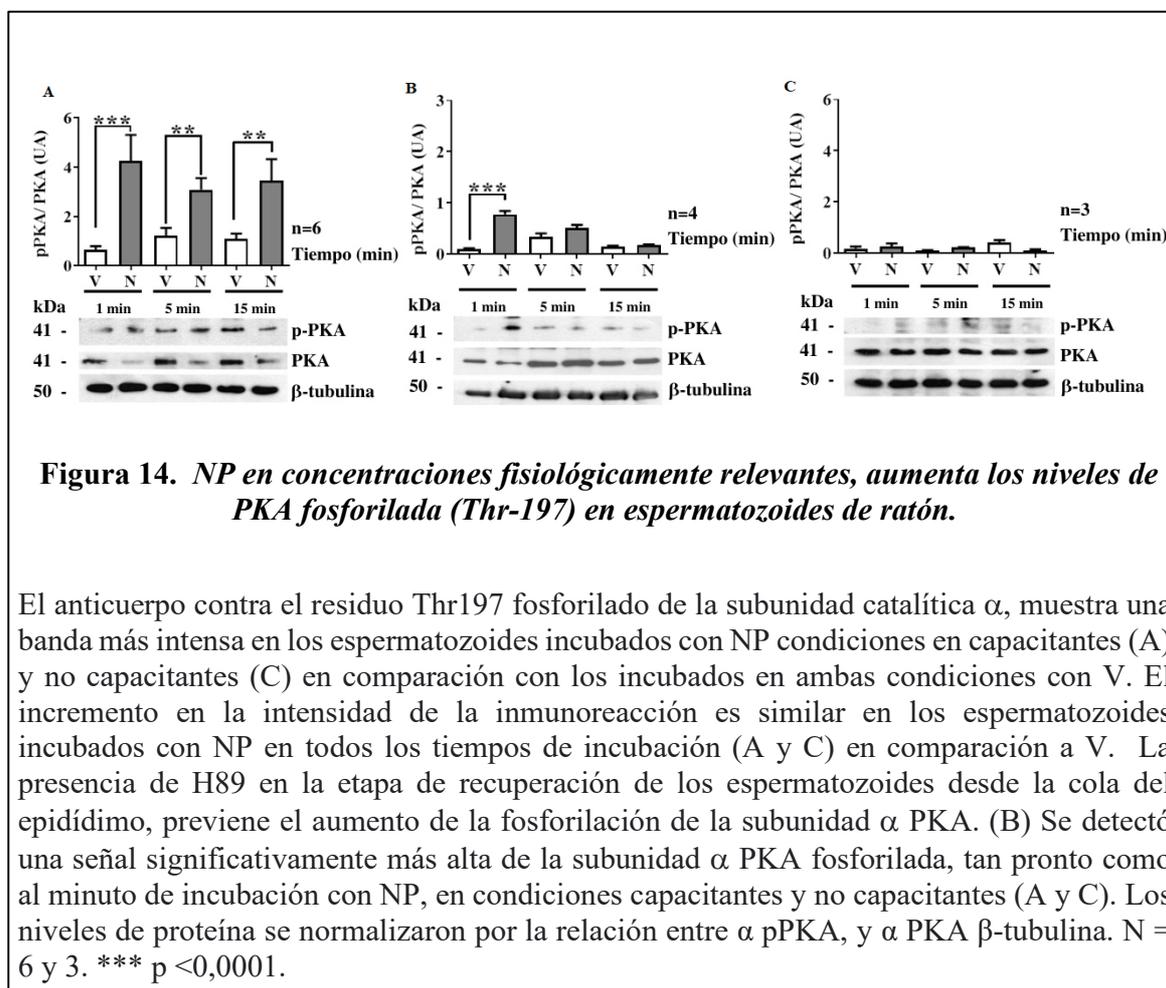
11.2. Evaluar si NP modula la capacitación alterando la fosforilación de sustratos en Ser/Thr, fosforilación de sustratos en Tyr y la activación de PKA.

La activación de la PKA es uno de los eventos relevantes que ocurren durante la capacitación en mamíferos. Para estudiar la posibilidad de que NP afectara la señalización mediada por esta enzima, en primer lugar, evaluamos si su activación en presencia de este compuesto. Al respecto, nuestra aproximación experimental inicial, fue examinar la activación de PKA mediante la evaluación de la fosforilación de residuos de Ser/Thr, en extractos totales de proteínas de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes o no capacitantes. Los resultados mostraron un aumento en el patrón de proteínas (número de bandas) fosforiladas en Ser/Thr en presencia de concentraciones crecientes de NP, en relación con aquellos incubados sin este compuesto (Figura 13A y C). Es interesante que, en condiciones no capacitantes, se observó un aumento en el patrón de fosforilación en Ser/Thr cuando los espermatozoides fueron incubados con 0,1 o 1 μM de NP en comparación con aquellos incubados en las mismas condiciones, pero sin el compuesto (Figura 13C). Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó el patrón de fosforilación en tirosina, pero a diferencia de lo anterior, en condiciones no capacitantes el patrón de marca fue igual a aquellos incubados en condiciones no capacitantes y sin NP. En ambos casos solo se detectó una banda de 90 kDa que corresponde a una proteína inespecífica.



La subunidad catalítica de la PKA se fosforila en la Thr-197 del sitio activo, y es un mecanismo conservado de su regulación en células somáticas. Estudios previos en ratón y cerdo han mostrado que este residuo es fosforilado luego de la incubación con [Sp-5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosylbenzimidazole-30,50-monophosphorothioate (cBiMPS) un

análogo de cAMP[274, 326]. Por ello nuestra segunda aproximación experimental para evaluar si NP inducía la activación de PKA, fue determinar la fosforilación de Thr-197 en la sub unidad catalítica α , por medio de *Western Blot* usando un anticuerpo específico que reconoce solo este residuo fosforilado. Para ello, los espermatozoides de ratón recuperados de la cola del epidídimo se extrajeron en MNC y luego se incubaron en MC y se evaluó la fosforilación de PKA. Los resultados mostraron que ya partir de 1 min de incubación con 0,1 mM NP se indujo un aumento en los niveles de inmunoreacción con el anticuerpo anti-Thr197 (Figura 14A y C). Por otra parte, al realizar este mismo experimento, pero en presencia de H89, un inhibidor del PKA, no observamos aumentos en la inmunoreacción (Figura 14B).



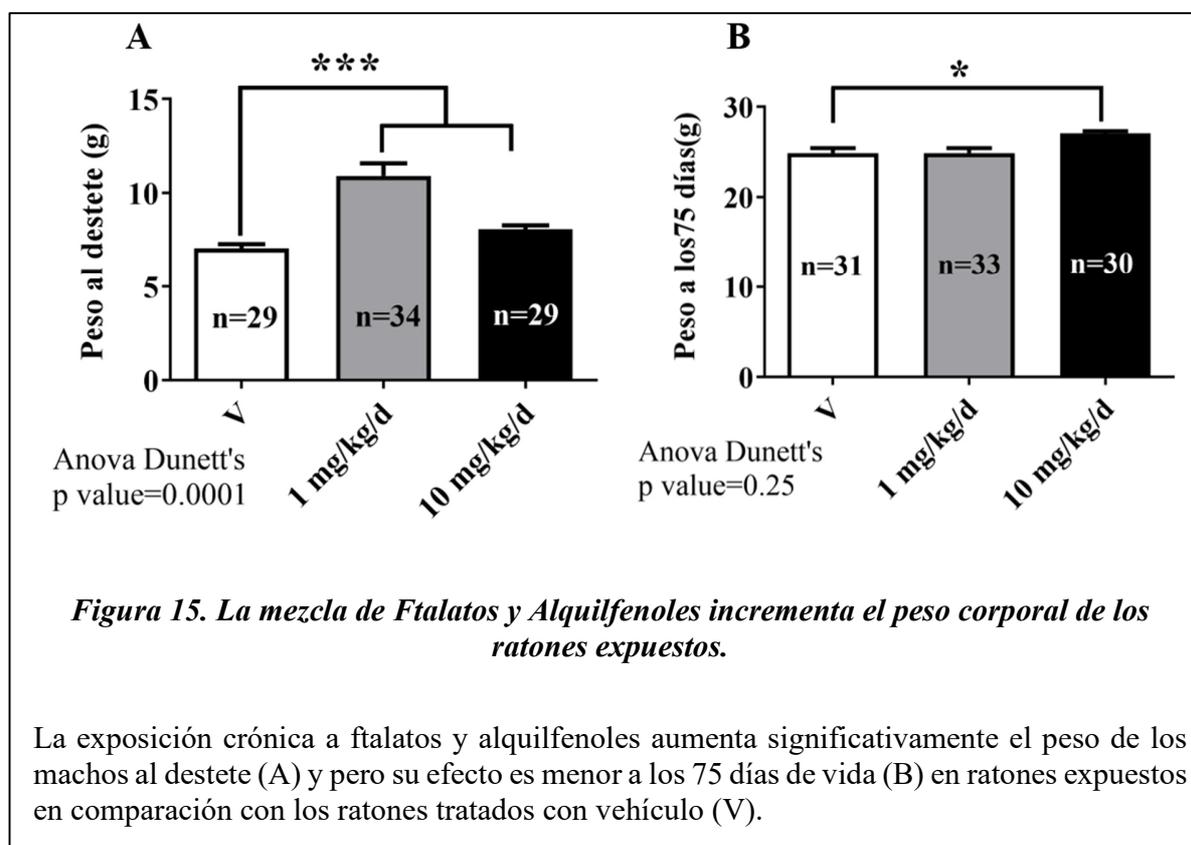
11.3. Resultados Objetivo General N°2 (Modelo de exposición crónica murina “*in vivo*”).

“Investigar si la administración crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles modifica la capacidad de fecundación, el perfil de RNA, los niveles de expresión de la enzima aromatasa (*Cyp19a1*) y del receptor nuclear de estrógeno *Erb*, vía la desregulación de los microRNAs que los modulan, en espermatozoides de ratón”.

11.3.1. Determinar el efecto crónico como disruptor endocrino, de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles en ratones macho.

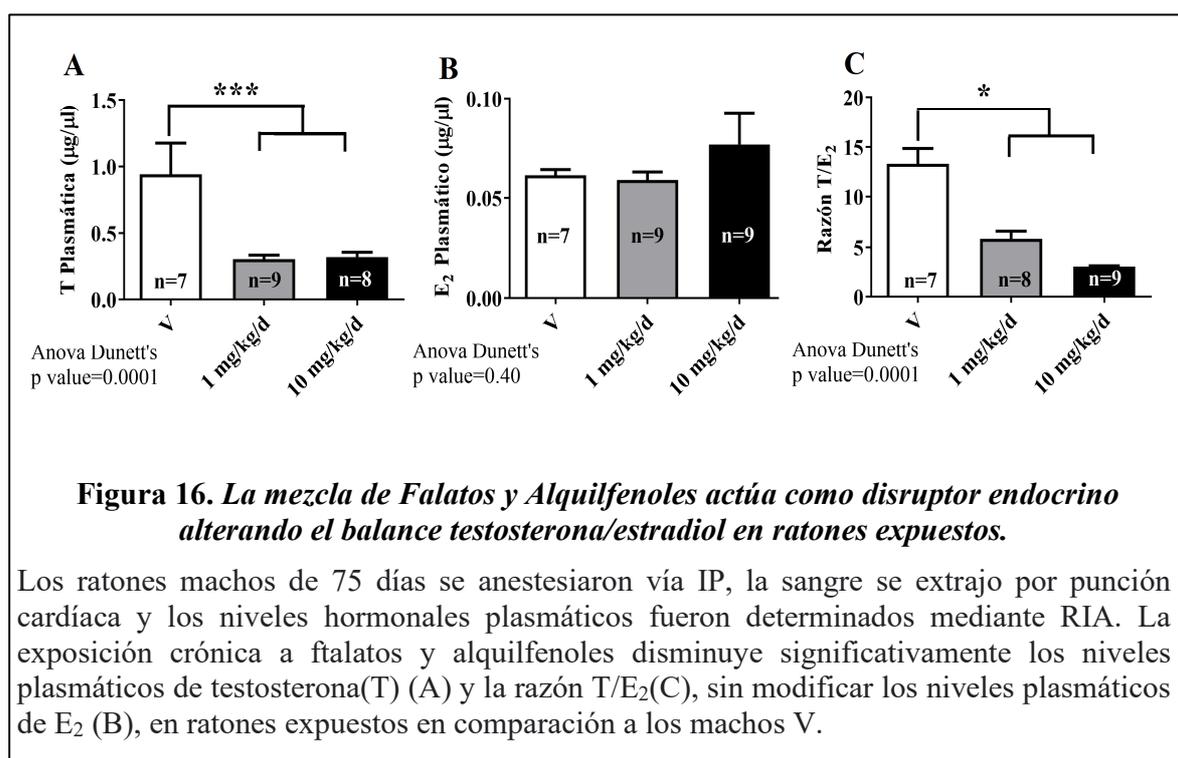
11.3.2. Determinar si la exposición crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles a ratones macho afecta la capacidad de fecundación de los espermatozoides.

Para realizar estos objetivos se procedió a utilizar el modelo experimental ya descrito en la sección correspondiente. Los resultados mostraron que al destete los machos experimentaron un aumento significativo en el peso corporal solo con la mezcla en la dosis menor (1mg/Kg/d, Figura 15A), pero que a los 75 días de edad este aumento de peso en relación a los controles se observó solo en la con la mezcla en la dosis mayor (10 mg/Kg/d, Figura 15B).



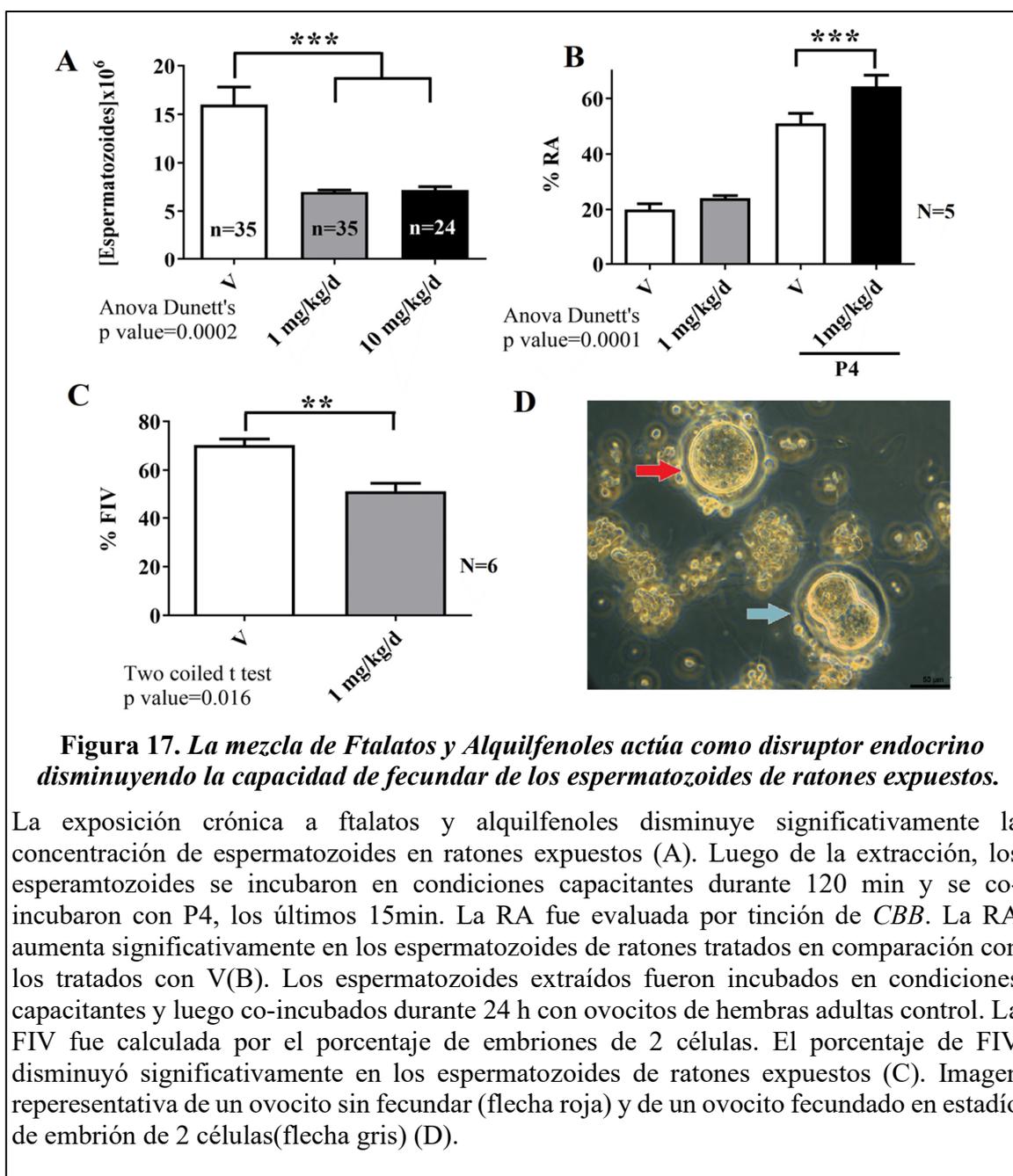
Posteriormente, se evaluaron los niveles plasmáticos de testosterona y E₂ (Figura 16). Los resultados mostraron que los niveles plasmáticos de testosterona disminuyeron significativamente en los machos adultos tratados con ambas dosis de ftalatos y alquifenoles (Figura 16A). Por otro lado, los niveles de E₂ fueron similares entre los ratones tratados con ambas dosis de la mezcla y aquellos tratados solo con vehículo (Figura 16 B). Además al razón testosterona/estradiol (T/E₂) se vió disminuida en los ratones adultos tratados con ambas dosis, en relación a los vehículos (Figura 16C). Dado los resultados anteriores, se escogió seguir trabajando solo con los ratones expuestos a la dosis menor de la mezcla, lo que se fundamenta en que: 1) es la dosis de la mezcla que refleja las concentraciones a que

los humanos estamos expuestos en condiciones no-ocupacionales; 2) pudimos determinar ciertas alteraciones en parámetros reproductivos que la hicieron interesante en seguir estudiando.



En cuanto a los parámetros reproductivos, los resultados mostrarán que los ratones adultos tratados con ambas dosis tuvieron una reducción de los espermatozoides epididimales en comparación con aquellos tratados con vehículo (Figura 17A). Posteriormente quisimos explorar si solamente ocurrió una reducción en la cantidad de espermatozoides o si además tenían alguna alteración en su capacidad de fecundación. Primeramente se evaluó la RA “*in vitro*”, como uno de los eventos claves que debe experimentar esta célula para lograr la

fecundación. En esta etapa decidimos continuar evaluando solo la mezcla menor ya que es la que refleja la exposición no-ocupacional en humanos. Los resultados mostraron que los espermatozoides de los ratones tratados con la dosis de 1 mg/Kg/d experimentaron niveles similares de la RA espontánea, pero ésta fue mayor que los controles en presencia de P4, el que es un inductor natural de este proceso (Figura 17B). Luego estudiamos si el tratamiento con esta mezcla de ftalato y alquilfenoles alteró la capacidad de fecundación. Para esto decidimos evaluar la tasa de fecundación “*in vitro*” como el porcentaje de embriones que llegaron al estado de dos células (Figura 17C, D). Los resultados mostraron que hubo una reducción en el porcentaje de embriones de dos células (como una aproximación a la tasa de fecundación) en aquellos ovocitos que fueron incubados con espermatozoides de los ratones tratados con la mezcla, en relación a los tratados con vehículo.



En conclusión, el tratamiento con ambas dosis, pero en particular con aquella que refleja la exposición no-ocupacional (1mg/Kg/d) induce, en ratones machos tratados desde la concepción hasta la adultez, alteraciones hormonales, en particular en parámetros

relacionados con la fecundación. Dado estos resultados pensamos que, debido a que el tratamiento se realizó con disruptores endocrino, se produjo alguna alteración en la maquinaria génica que lleva a la producción de espermatozoides. Como una manera de aproximación a responder a esta pregunta, decidimos evaluar el estado del RNA en estas células.

11.3.3. Determinar si la exposición crónica de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles a ratones macho modifica los niveles y perfil del RNA de los espermatozoides.

Para desarrollar este objetivo, se extrajeron espermatozoides maduros de la cola del epidídimo, en las condiciones ya explicadas previamente, y posteriormente se extrajo RNA total. Los resultados mostraron que hubo un aumento en el contenido del RNA total evaluado en función de la cantidad de espermatozoides (Figura 18A) o del volumen de la muestra (Figura 18B), en espermatozoides extraídos de los ratones tratados con la mezcla en relación a los tratados con vehículo.

Además, estudiamos si este aumento en la cantidad de RNA total tenía la misma composición o se encontraba alterado en relación a los controles. Para esto, el RNA extraído se sometió a una electroforesis (Figura 18C) y luego se cuantificó la intensidad de cada una de las bandas. En la parte superior de la Figura 18C se muestra el perfil electroforético de los espermatozoides extraídos de los ratones tratados con vehículo (a) y en la inferior en aquellos provenientes de los ratones tratados con la dosis de 1 mg/Kg/d (b).

Como se observa en la figura el patrón general es diferente entre las dos muestras. Destaca un aplanamiento en la curva en la zona entre los 200 y 1000 nt, lo que refleja una disminución en los niveles en esta población de RNAs. También se observan tres picos que corresponden a la zona donde migran los RNA ribosomales (rRNAs) de las subunidades 18S y 28S. Es probable que estos rRNAs se observen más claramente en los ratones expuestos debido a la disminución importante en los otros RNA que los podrían haber estado enmascarando. Por último, los resultados mostraron un aumento en los RNA correspondientes a la zona de alrededor de los 100nt (Figura 18C, flecha roja).

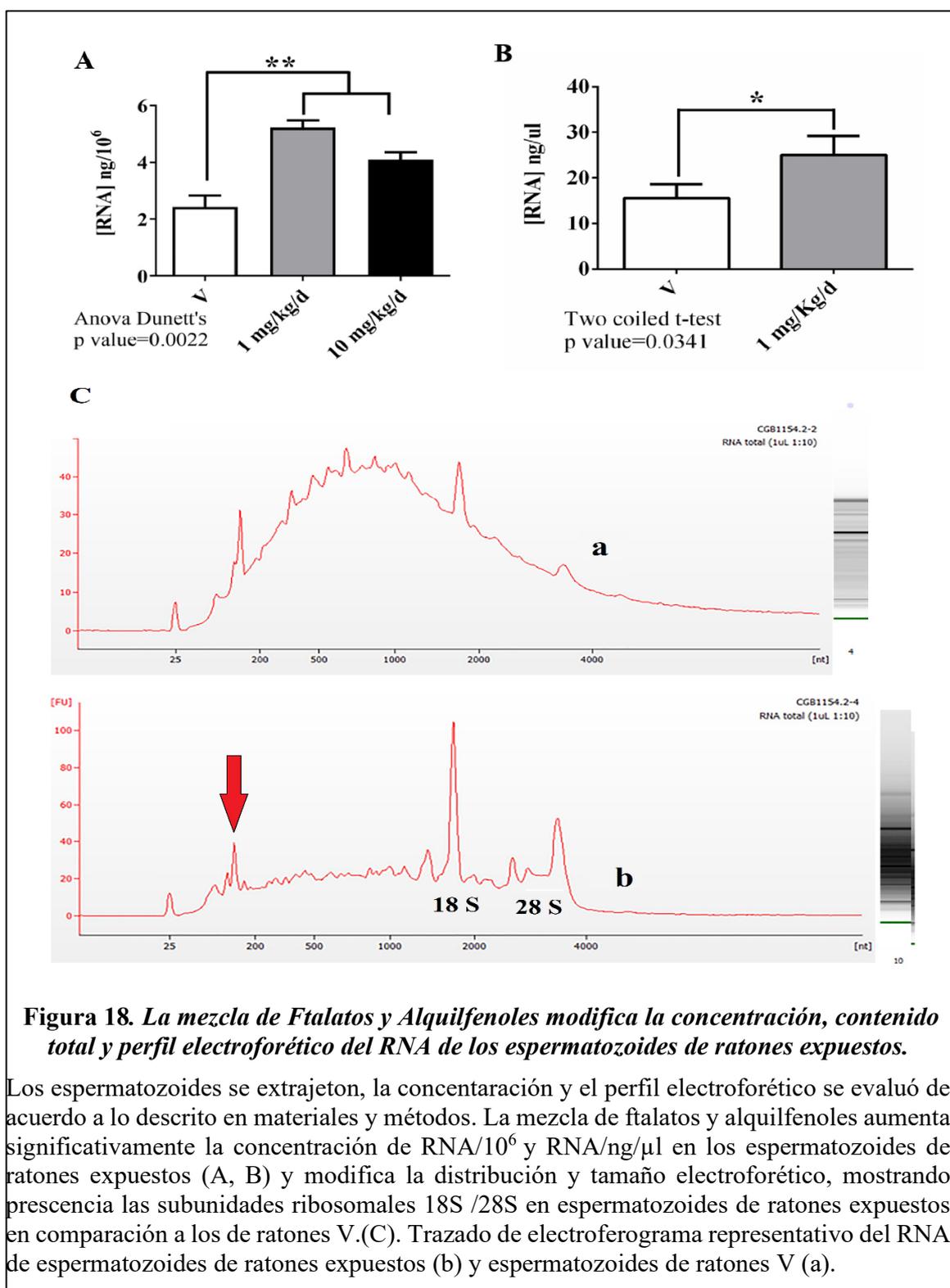


Figura 18. La mezcla de Ftalatos y Alquifenoles modifica la concentración, contenido total y perfil electroforético del RNA de los espermatozoides de ratones expuestos.

Los espermatozoides se extrajeron, la concentración y el perfil electroforético se evaluó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. La mezcla de ftalatos y alquifenoles aumenta significativamente la concentración de RNA/10⁶ y RNA/ng/μl en los espermatozoides de ratones expuestos (A, B) y modifica la distribución y tamaño electroforético, mostrando presencia las subunidades ribosomales 18 S /28S en espermatozoides de ratones expuestos en comparación a los de ratones V.(C). Trazado de electroferograma representativo del RNA de espermatozoides de ratones expuestos (b) y espermatozoides de ratones V (a).

Por otro lado, buscando tener una perspectiva global y visualizar si existía una expresión diferencial de genes contenidos en el RNA de espermatozoides de ratones expuestos (EE) y de espermatozoides de ratones tratados con vehículo (EC), empleamos modelos estadísticos para el análisis integrativo de experimentos multi-transcriptómicos, como fue este caso. (Figura 19A , B y C). Estos análisis nos entregaron información sobre la expresión diferencial global del transcriptoma total de las tres muestras de espermatozoides de ratones expuestos (EE) y de ratones control (EC) y a la vez nos permitieron visualizar las similitudes de expresión de genes entre los tres grupos de EE y EC. En la Figura 19A observamos una matriz de correlación (Corrplot) en que se analiza la asociación entre dos variables, en este caso los genes expresados los grupos EE y los grupos EC. Este tipo de interpretación determina cual es la proporción total de Y que puede ser explicada por la variación en X, empleando el coeficiente de determinación (r^2) o índice de correlación, que puede variar entre -1 y +1 como medida de la proporción de variabilidad de una variable. En este tipo de análisis, un $r = 0$ significa que no hay relación entre las dos variables, un r positivo indica que ambas variables varían en el mismo sentido y un r negativo significa que a ambas variables varían en sentidos opuestos, mientras más lineal sea la figura geométrica nos indica que hay una mayor dependencia entre ambas variables y mientras más elíptica sea la figura hay una menor dependencia llegando a ninguna dependencia (0) con una figura representada en el gráfico como una elipse. Por tanto en nuestro Corrplot (A) observamos que cada *cluster* de genes estaba representado por una figura geométrica que ocupaba un lugar en el espacio y que las similitudes entre estos grupos de genes tenían relación con el espacio y cercanía en la matriz. Los *cluster* de genes que estaban en la parte superior tienen índices de correlación positiva y los de la parte inferior negativa, los *cluster* cuya figura geométrica es cercana a lo lineal

muestran que la correlación de la expresión es dependiente y si la figura geométrica es similar a una elipse significa que su correlación no es dependiente o no existe correlación. Por tanto nuestros resultados mostraron que los genes expresados en las muestras EE son diferentes a los expresados en las muestras EC y que no hay una correlación en la expresión diferencial de genes entre cada uno de los grupos. De igual forma, en la figura 19B observamos el gráfico MDS (*multidimensional scales plot of distance*), que es un gráfico de dispersión, que nos mostró las distancias o disimilitudes entre los grupos de genes expresados en EE y EC. En este caso, nos llamó la atención la separación entre los dos grupos, es decir, las muestra de espermatozoides expuestos (EE_1, EE_2, EE_3) se encuentran al lado positivo del eje X y las muestras de espermatozodes tratados con V se encuentran al lado negativo del eje X (EC_1, EC_2, EC_3), evidenciando una clara diferencia en la expresión de genes entre ambos grupos y a la vez la similitud entre las muestras de repetición de cada uno de ellos. Finalmente en la figura 19C usamos una matriz de expresión visual (*heat map*) donde la intensidad de la fluorescencia nos indica el nivel de expresión de un gen. En color rojo observamos la sobre expresión, en color verde la subexpresión y en color negro mostró que no hay cambios en la expresión. Al respecto, nuestros resultados mostraron que *cluster* de genes sobre expresados en los EE están sub expresados en los EC e igualmente, en forma contraria, además que existió mayor similitud en las repeticiones de los grupos de EE y de EC, corroborando los resultados obtenidos en A y B.

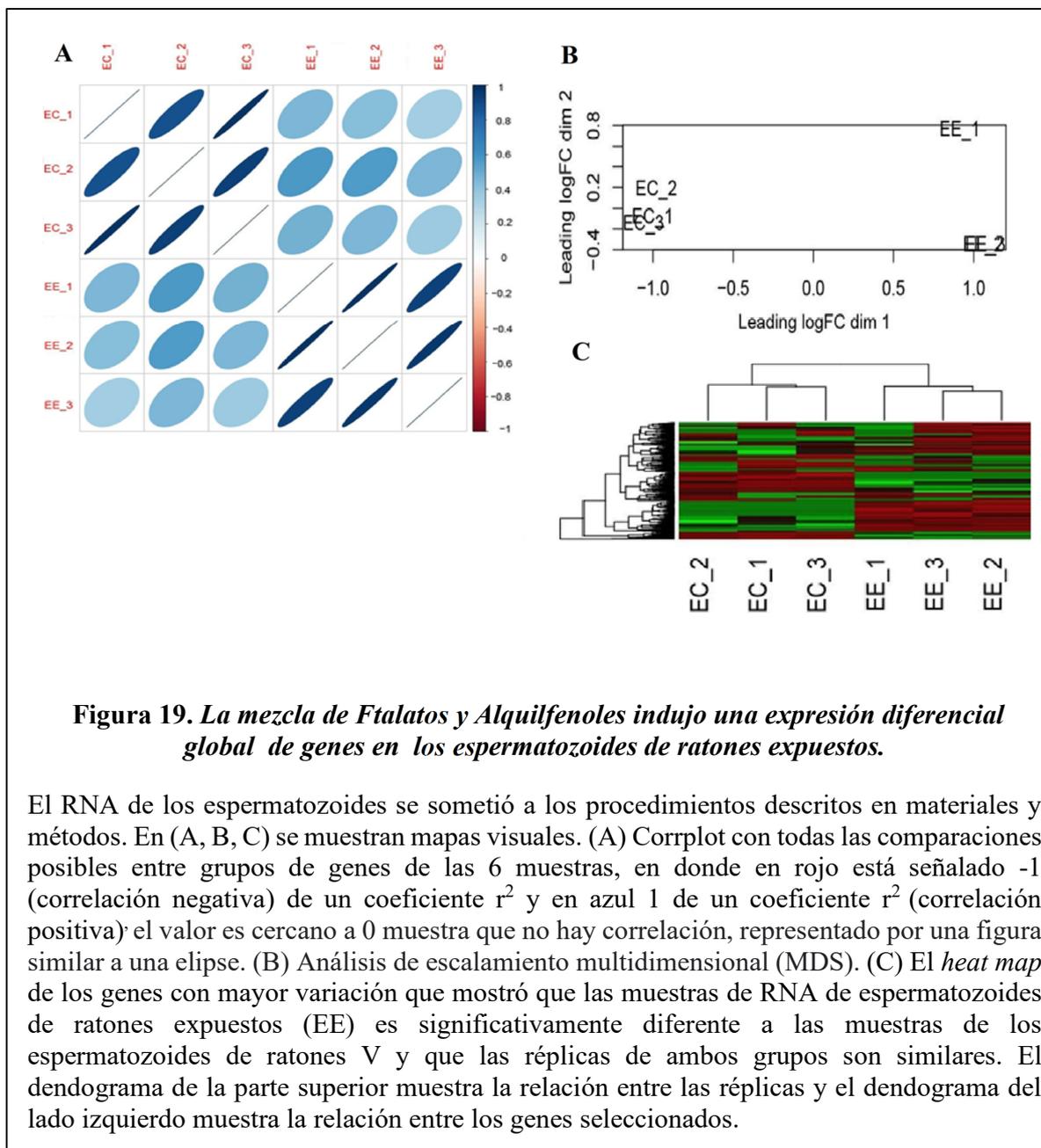


Figura 19. La mezcla de Ftalatos y Alquifenoles indujo una expresión diferencial global de genes en los espermatozoides de ratones expuestos.

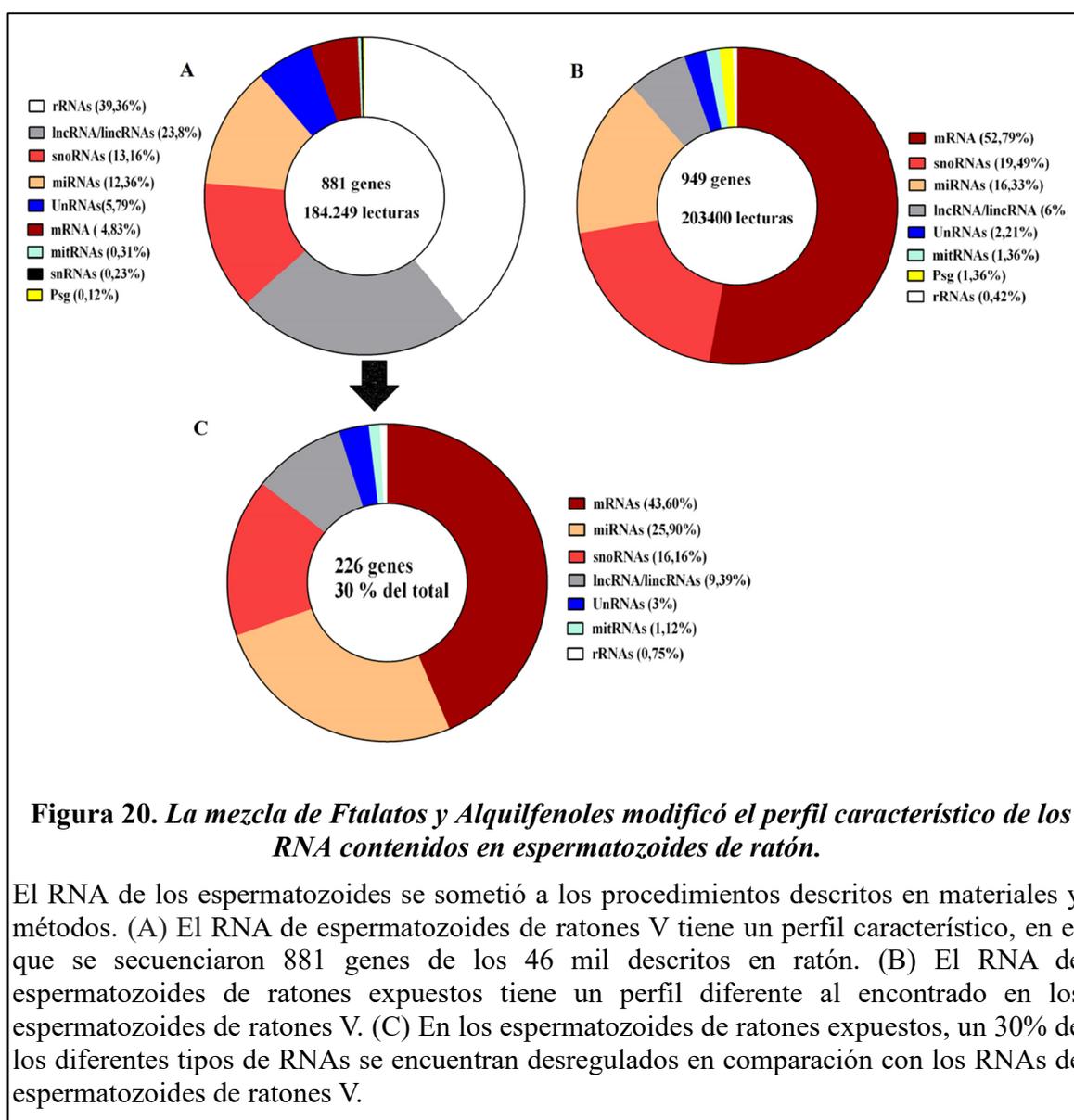
El RNA de los espermatozoides se sometió a los procedimientos descritos en materiales y métodos. En (A, B, C) se muestran mapas visuales. (A) Corplot con todas las comparaciones posibles entre grupos de genes de las 6 muestras, en donde en rojo está señalado -1 (correlación negativa) de un coeficiente r^2 y en azul 1 de un coeficiente r^2 (correlación positiva); el valor es cercano a 0 muestra que no hay correlación, representado por una figura similar a una elipse. (B) Análisis de escalamiento multidimensional (MDS). (C) El *heat map* de los genes con mayor variación que mostró que las muestras de RNA de espermatozoides de ratones expuestos (EE) es significativamente diferente a las muestras de los espermatozoides de ratones V y que las réplicas de ambos grupos son similares. El dendograma de la parte superior muestra la relación entre las réplicas y el dendograma del lado izquierdo muestra la relación entre los genes seleccionados.

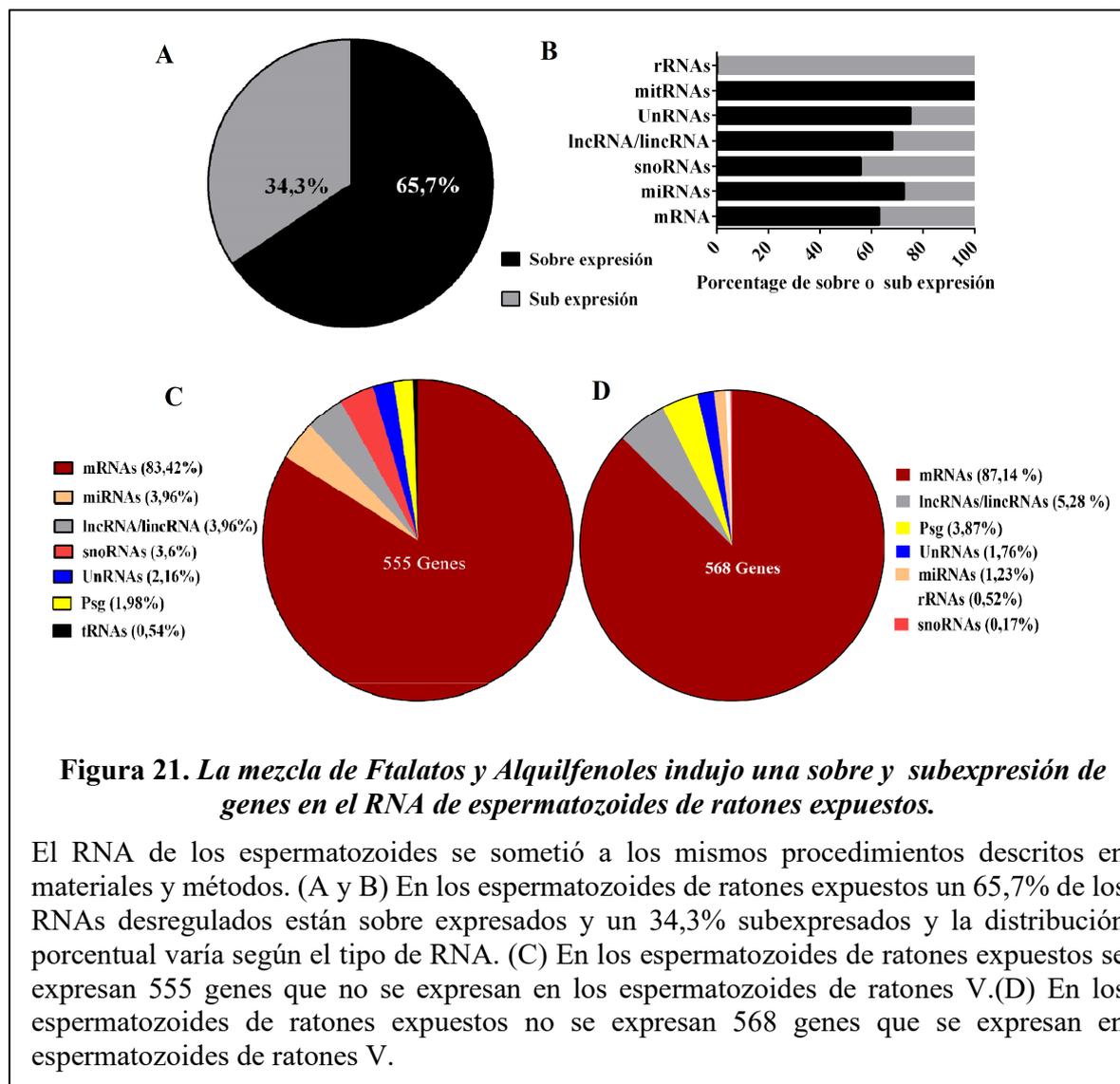
El análisis de correlación global, de MDS plot y el *heat map*, señalaron que las muestras de RNA de los espermatozoides de ratones expuestos (EE) eran significativamente diferentes a las de ratones V (EC) y que las réplicas de cada uno de los grupos eran similares entre sí (19 A, B, C).

Posteriormente, quisimos determinar si los tipos de RNA contenidos en los espermatozoides de ratones control (V) era similar al encontrado en otras investigaciones y si este perfil se mantenía en los espermatozoides de ratones expuestos. El análisis mostró que, luego de obtener más de 184.000 lecturas en el RNA de espermatozoides de ratones control, se lograron identificar 881 secuencias asociadas con distintos tipos de RNAs (Figura 20A). Para fines de esta tesis a estas secuencias identificadas las llamaremos “genes”. Los resultados mostraron que en los espermatozoides controles la mayor proporción (en cuanto al número de lecturas, que es una medida de la abundancia de cada molécula) son los rRNAs y los no-codificantes largos y los no-codificantes intergénicos (lncRNA/lincRNAs). Estos tipos están seguidos por los RNA nucleares pequeños (snoRNAs) y los microRNAs (miRNAs). Este perfil cambió en el caso del RNA aislado de espermatozoides provenientes de ratones tratados con la mezcla (Figura 20B). Se pudieron identificar un total de 949 genes (o tipos de secuencias distintas), y en este caso la mayor proporción fueron los RNA mensajeros (mRNAs), seguido por los snoRNAs y los miRNAs. De estos genes, o secuencias, encontradas, 30% se encontró diferencialmente expresado entre las dos muestras (Figura 20C b) y de estos, la mayor proporción corresponde a mRNAs (43,6%), seguido por miRNAs (25,9%) y snoRNAs (16,6%).

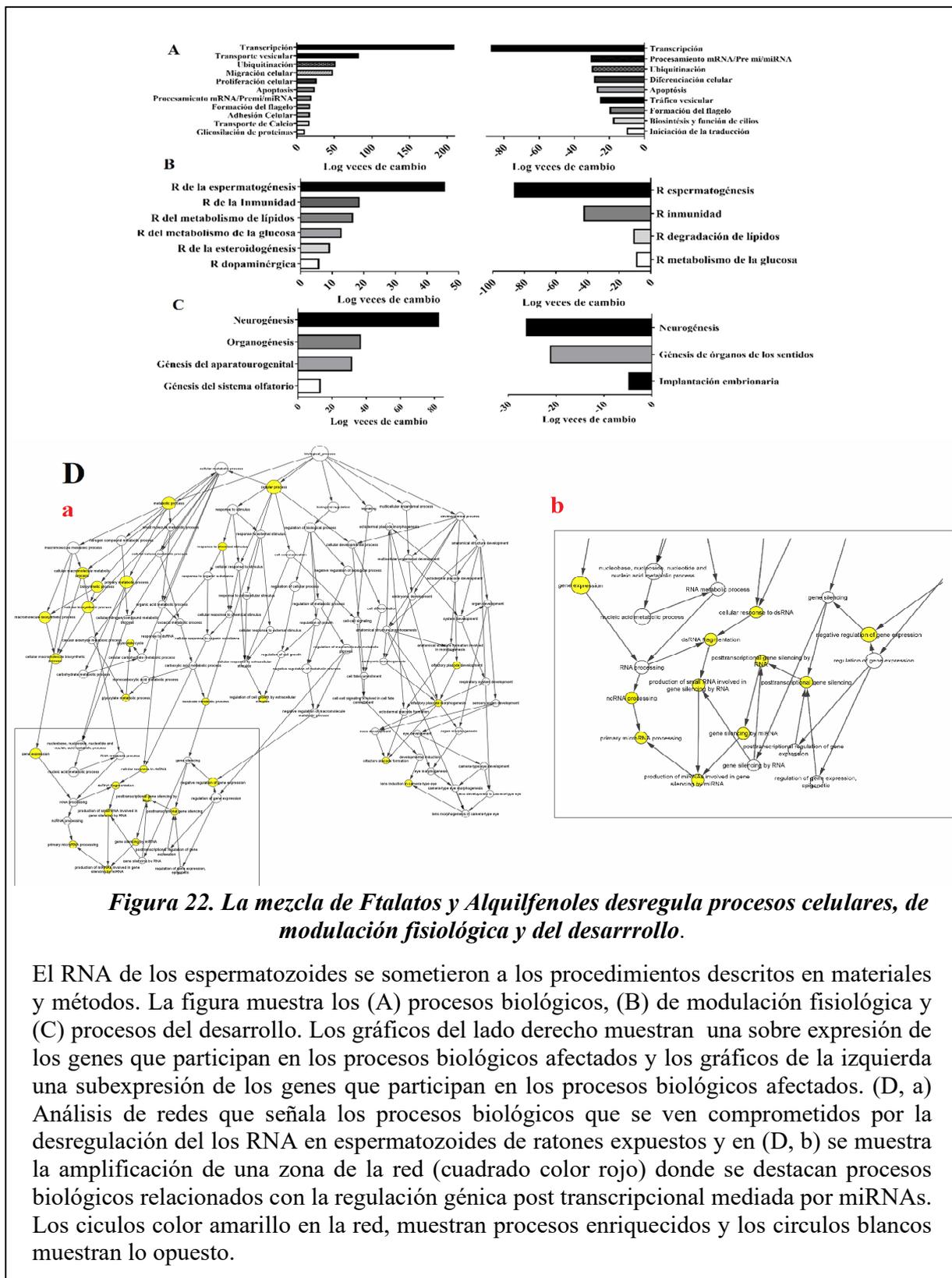
Por otro lado, pudimos observar que de aquellos genes que se encontró estaban diferencialmente expresados (que correspondieron a un total de 226), alrededor de un 34% disminuyó y un 66% aumento su expresión en las muestras tratadas en relación al control (Figura 21A). Del total de todos los transcritos, los rRNAs son los que más disminuyeron, en contraste con los RNA mitocondriales (mitRNA) que fueron los que más aumentaron, en

cuanto a los demás, su distribución fue variable (Figura 21B). En este mismo sentido, se encontró que hubo varios genes que como los miRNAs, que, dada su importancia en el proceso de regulación génica, se continuó estudiando, ya que, además, es una de las poblaciones que más cambia con el tratamiento y que alrededor de un 70% de ellos se encuentra sobre expresado en las muestras tratadas (Figura 21B).





Ahora con esta lista de genes, y haciendo uso de las herramientas de ontología génica (GO) y de la visualización de redes de interacción molecular integradas a los perfiles de expresión génica, determinamos los procesos biológicos y las funciones moleculares que se encuentran enriquecidas (alteradas). Los datos señalan que muchos de los términos de GO que se encuentran alterados se enmarcan en diversas funciones y uno de los principales es la regulación post transcripcional mediada por miRNAs (Figura 22D a y b), ubiquitinación, regulación de la espermatogénesis y organogénesis, entre otros (Figura 22A, B, C).

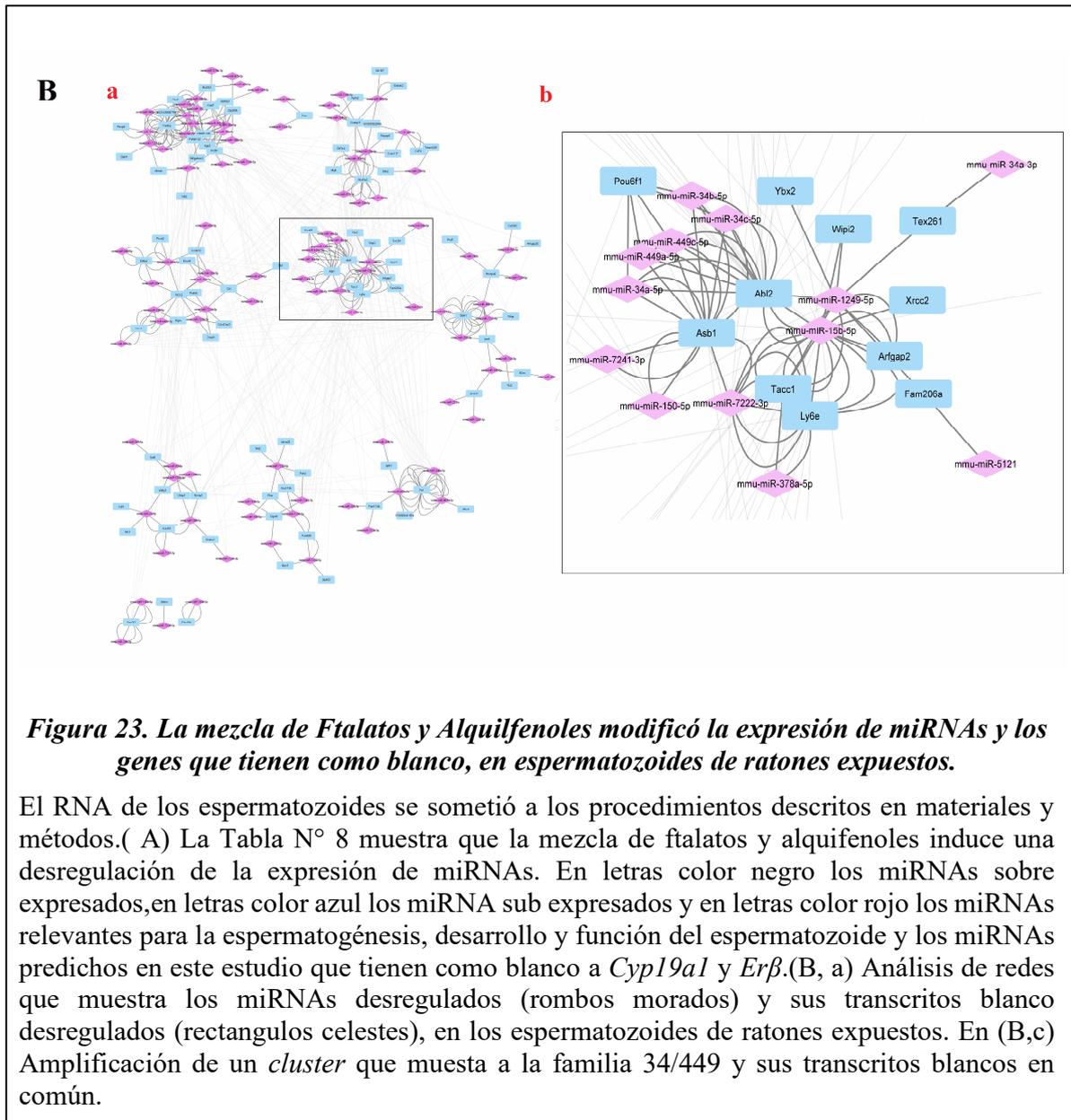


Posteriormente, con el objetivo de realizar análisis más específicos y considerando la relevante información recabada con los resultados previos, determinamos los principales miRNAs cuya expresión se encontró desregulada en los espermatozoides de los ratones expuestos. En la Figura 23A, la Tabla 8 muestra los 50 miRNAs más relevantes sobre expresados en color negro, los 19 miRNAs sub expresados en color azul y además destacamos 11 miRNAs que son importantes para la regulación de la espermatogénesis. Dentro de los 11 destacados encontramos a la familia 34/449 que está compuesta por seis miRNAs muy conservados en diversas especies y tipos celulares y que está compuesta por los miRNAs 34a, b, c y 449a, b, c. Por otro lado, es importante destacar que dentro de nuestro análisis bioinformático previo para determinar los miRNAs que tenían como blanco a *Cyp19a1* y *Erβ*, predijo a la familia de miRNAs 30, el miRNA 200b, 7b y 92a que también se encontraron entre los principales 69 miRNAs desregulados en este estudio. Posteriormente, quisimos relacionar los transcritos desregulados que son blanco de los miRNAs desregulados en los espermatozoides de ratones expuestos. Para ello, se realizó un análisis de redes donde en la figura 23 Ba pudimos observar *clúster* de transcritos desregulados representados en rectángulos celeste que son blanco de miRNAs desregulados representados en rombos morados. Al realizar puntualmente los *clúster* de la red, encontramos a la familia de miRNAs 34/449 que se destacó en un círculo rojo y que tenían como blanco genes en común. En la figura 23Bb se muestra una amplificación del *clúster* regulado por la familia 34/449. En cuanto a transcritos significativos que se encuentran desregulados en los espermatozoides de ratones expuestos pertenecientes a un mismo proceso biológico, como la regulación post transcripcional mediada por miRNAs, se encuentra sobre expresada la subunidad catalítica Argonauta (*Ago2*) que es una endonucleasa

componente activo de RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) cuya función es clivar el mRNA que está unido por complementariedad a un miRNA o siRNA. Por otro lado, en relación al mismo proceso biológico se encuentra sub expresado *Dgcr8*, la subunidad del microprocesador, que también es conocida como *Pasha* (partner of *Drosha*) que se une a *Drosha* para formar el microprocesador que cliva los Pri-miRNAs, el transcrito primario que al procesarse da origen a un Pre-miRNA y posteriormente a un miRNA.

A) Tabla 8. Principales miRNA sobre o sub expresados en espermatozoides de ratones expuestos.

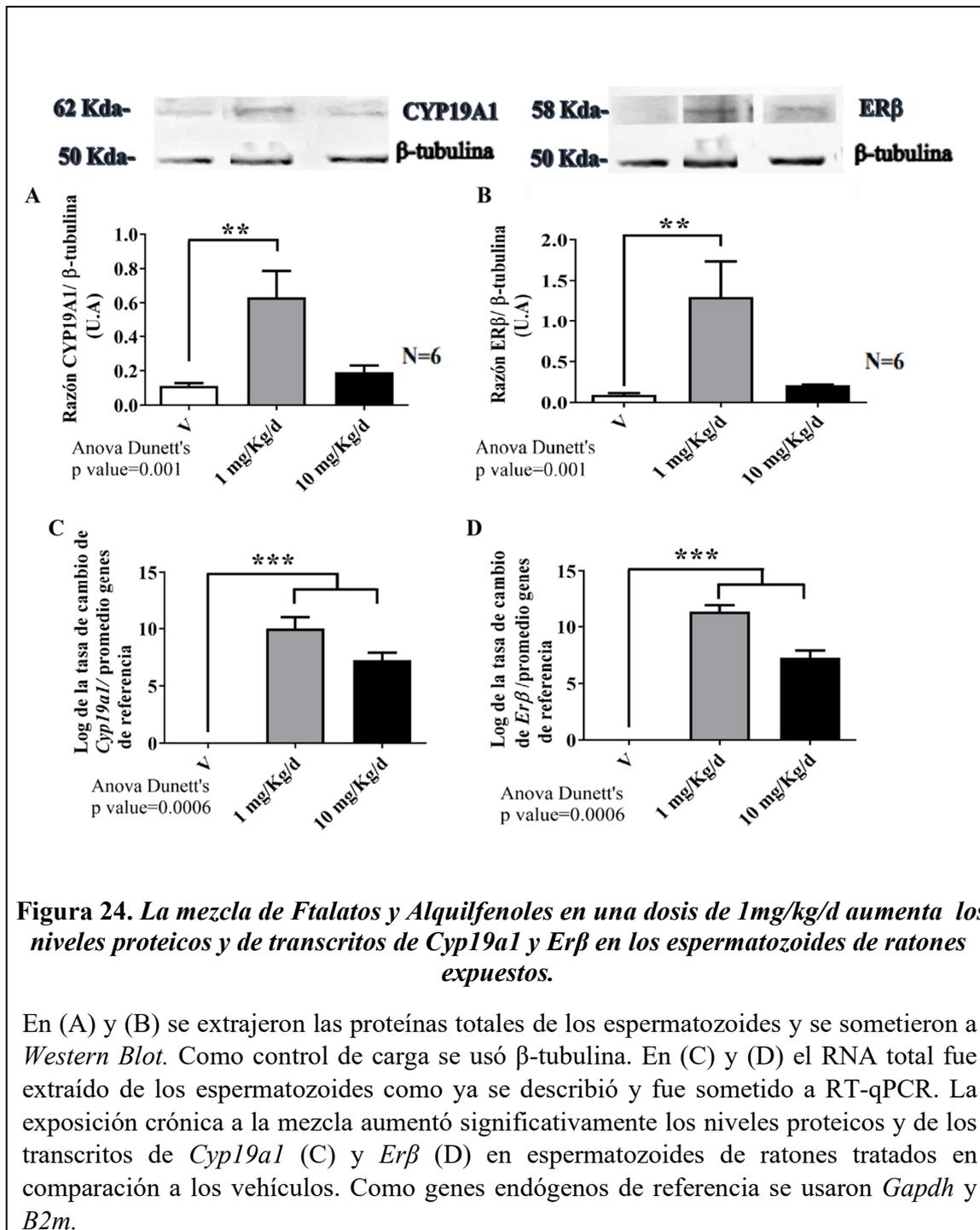
Gen	log 2FC	Nombre	Gen	log 2FC	Nombre
ENSMUSG00000065417	6,81422956	miRNA 340	ENSMUSG00000078038	3,30032652	miRNA881
ENSMUSG00000065493	6,2022061	miRNA 34a	ENSMUSG00000065409	3,29344681	miRNA 30e
ENSMUSG00000076146	6,20174185	miRNA 449c	ENSMUSG00000105585	3,29344681	miRNA 30f
ENSMUSG00000104804	6,13563385	miRNA 7233	ENSMUSG00000065475	2,92772384	miRNA27b
ENSMUSG00000065575	5,70120823	miRNA 449a	ENSMUSG00000105142	2,82097363	miRNA7214
ENSMUSG00000076005	5,42526949	miRNA 547	ENSMUSG00000070078	2,77498161	miRNA 463
ENSMUSG00000106215	4,90111116	miRNA 7218	ENSMUSG00000065505	2,44756291	miRNA148a
ENSMUSG00000065587	4,7279559	miRNA 34c	ENSMUSG00000096832	2,41502346	miRNA3096
ENSMUSG00000105723	4,61559596	miRNA 7210	ENSMUSG00000065527	2,38066905	miRNA 93
ENSMUSG00000106154	4,49994326	miRNA 7232	ENSMUSG00000065503	2,33804896	miRNA 351
ENSMUSG00000106253	4,49951914	miRNA 468	ENSMUSG00000065580	2,31707283	miRNA 15b
ENSMUSG00000096628	4,45554984	miRNA 871	ENSMUSG00000070073	2,30960129	miRNA 470
ENSMUSG00000105381	4,23507764	miRNA 7234	ENSMUSG00000065507	2,27531086	miRNA 204
ENSMUSG00000070071	4,23351409	miRNA 465	ENSMUSG00000065476	2,26473737	miRNA 30b
ENSMUSG00000093011	4,1553925	miRNA 100	ENSMUSG00000065564	1,64103696	miRNA 7b
ENSMUSG00000064938	4,08169705	miRNA 3068	ENSMUSG00000065500	1,5432871	miRNA 10b
ENSMUSG00000065405	4,08109484	miRNA 30a	ENSMUSG00000070130	-1,4886475	miRNA 328
ENSMUSG00000094184	4,08068686	miRNA 743b	ENSMUSG00000098973	-1,9739733	miRNA6236
ENSMUSG00000078017	3,90516893	miRNA883a	ENSMUSG00000065492	-1,9755622	miRNA 34b
ENSMUSG00000065610	3,89613703	miRNA 29a	ENSMUSG00000105200	-2,0464502	miRNA378a
ENSMUSG00000065574	3,81276301	miRNA 203	ENSMUSG00000065519	-2,5498291	miRNA 10a
ENSMUSG00000077119	3,80697441	miRNA 741	ENSMUSG00000104627	-2,8842266	miRNA3535
ENSMUSG00000078002	3,77070014	miRNA 880	ENSMUSG00000065613	-3,0622512	miRNA92a
ENSMUSG00000065445	3,72599369	miRNA143	ENSMUSG00000080356	-3,2468317	miRNA1247
ENSMUSG00000098406	3,70870082	miRNA 7222	ENSMUSG00000065446	-3,6669204	miRNA 139
ENSMUSG00000098446	3,68353487	miRNA 7242	ENSMUSG00000080441	-3,7264075	miRNA1249
ENSMUSG00000105913	3,67987552	miRNA 5121	ENSMUSG00000098771	-4,0327708	miRNA6538
ENSMUSG00000065410	3,63132895	miRNA 298	ENSMUSG00000080452	-4,3477959	miRNA1306
ENSMUSG00000065483	3,6159585	miRNA 181c	ENSMUSG00000065420	-5,0170677	miRNA142b
ENSMUSG00000098937	3,580849	miRNA 7241	ENSMUSG00000105196	-5,0170677	miRNA142a
ENSMUSG00000105778	3,48416554	miRNA 7229	ENSMUSG00000065533	-5,1742865	miRNA 205
ENSMUSG00000104840	3,43238724	miRNA 7230	ENSMUSG00000065462	-5,4152037	miRNA200b
ENSMUSG00000065529	3,33497332	miRNA 22	ENSMUSG00000106471	-6,6544171	miRNA3107
ENSMUSG00000106578	3,31897083	miRNA 7217	ENSMUSG00000070084	-6,6544171	miRNA486
			ENSMUSG00000065495	-7,4486364	miRNA 150

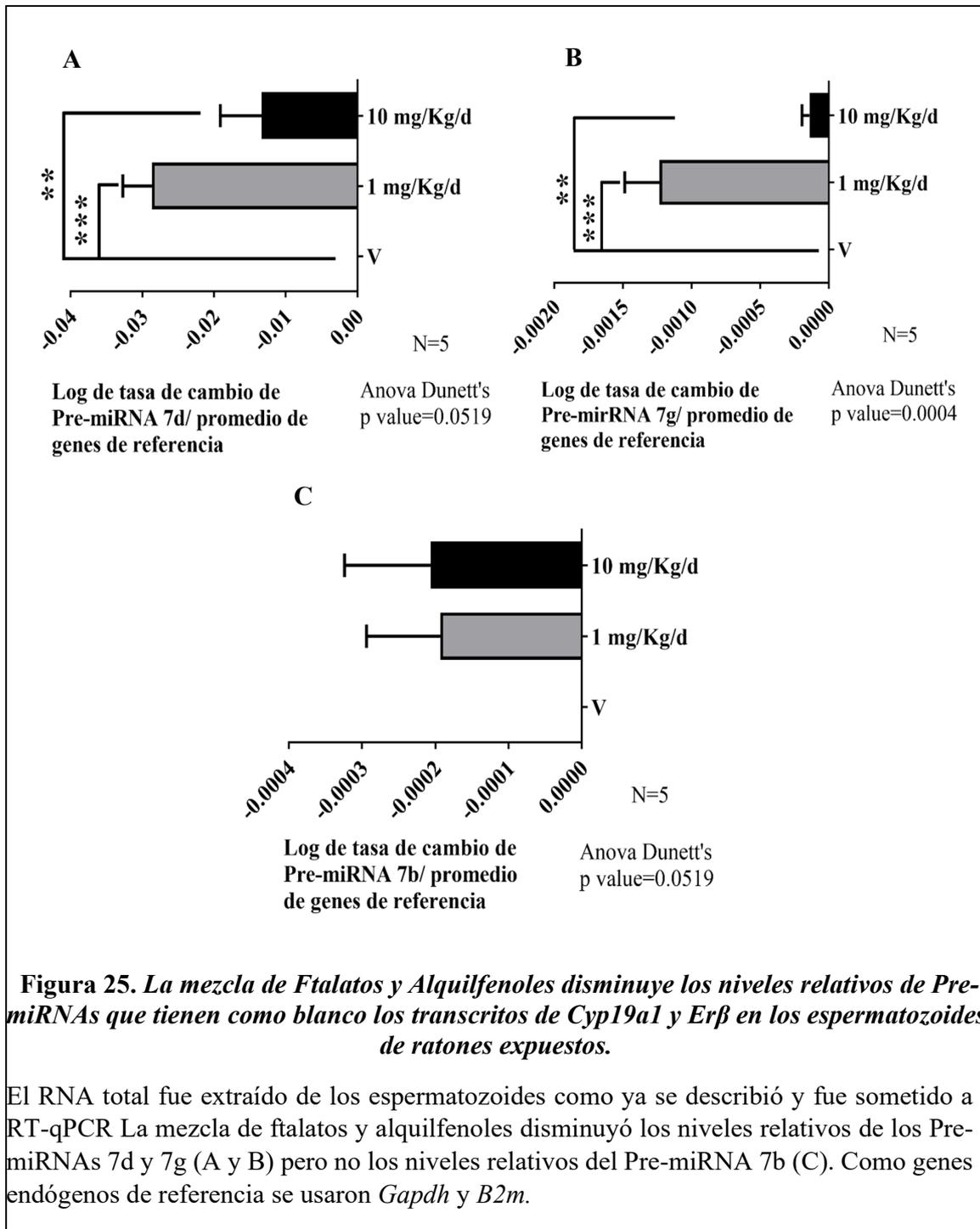


11.3.4. Determinar si la exposición crónica de una mezcla de ftalatos y alquifenoles a ratones macho modifica, en los espermatozoides, los niveles de expresión de *Cyp19a1*, *Erβ* y de los miRNAs que los modulan.

Como última etapa de esta investigación, se estudió como el tratamiento con la mezcla de ftalatos y alquifenoles podría modificar el funcionamiento de la vía del estrógeno en el espermatozoide. Para ello, se usó el mismo modelo “*in vivo*” ya mencionado y en las muestras de RNA de espermatozoides se evaluaron los niveles del mRNA que codifica para la *Cyp19a1* y el receptor de estrógenos β (*Erβ*). Los resultados indicaron que los espermatozoides de los ratones expuestos a ambas dosis mostraron un aumento de al menos 5 veces para ambos mRNAs (Figura 24A, B). En concordancia con esto, los niveles proteicos de la CYP19A y para el ER β fueron significativamente mayores en las muestras tratadas con la dosis menor (Figura 24C, D). Sin embargo, los niveles de ambas proteínas fueron similares al control en aquellos tratados con la dosis más alta (Figura 24C, D).

Estudios previos indican que el miRNA 7 y algunas de sus variantes, tienen como blanco de regulación al mRNA de *Erβ*. Es por ello que evaluamos los niveles de los precursores de miRNAs 7b, c y g en las muestras tratadas y controles. (Figura 25). Los resultados mostraron que los tres Pre-miRNAs evaluados aumentaron significativamente sus niveles en las muestras tratadas con ambas dosis. Esto confirma el resultado de la secuenciación en que se observó una sobre expresión de miRNA 7b en las muestras tratadas.





12. DISCUSIÓN

12.1. Efecto agudo de Nonilfenol y DEHP como inductor de la RA y modulador de la capacitación del espermatozoide de ratón.

Muchos tóxicos medio ambientales, tales como los compuestos contenidos en los plásticos, xenoestrógenos y algunos pesticidas, tienen un impacto negativo en la fertilidad actuando como DES, los que pueden regular (o desregular) procesos fisiológicos como el movimiento celular, las vías de señalización o la secreción de proteínas por mecanismos de activación no estrictamente relacionados con sus efectos endocrinos (Ej: RA o fosforilación de proteínas)[327]. En relación a lo anterior, la RA es la exocitosis de la vesícula acrosómica que permite que los espermatozoides atraviesen las diferentes capas que rodean al ovocito, por tanto, es el paso clave y final de una serie de vías de señalización bioquímicas conocidas como capacitación, que deben ser experimentadas por los espermatozoides “*in vivo*” o “*in vitro*” para fecundar el óvulo. Se ha demostrado que algunos DES “*in vitro*” modulan el estado de capacitación y los niveles intracelulares de Ca^{+2} en los espermatozoides humanos, lo que sugiere que podrían modular la RA y la fecundación.

En la primera parte de este estudio, espermatozoides de ratón fueron expuestos “*in vitro*” a DEHP y NP, dos tipos de tóxicos que formaron parte de esta investigación por su relevancia reconocida como contaminantes ambientales. En condiciones fisiológicas los espermatozoides de los mamíferos se enfrentan a un medio químico en constante cambio,

que va desde el fluido seminal hasta secreciones de las células que recubren el tracto genital femenino, las del óvulo y al líquido folicular que se vierte en el oviducto durante la ovulación[24]. Esto hace que se vean enfrentados a diferentes estímulos algunos de los cuales pueden ser adversos, otro neutros o bien “benéficos” para su sobrevivencia. En este sentido, un ambiente “*in vitro*” no puede emular en estricto rigor al ambiente “*in vivo*” al que se enfrenta el espermatozoide, más cuando la exposición a los compuestos en estudio varía de acuerdo a la naturaleza química como por ejemplo estabilidad, solubilidad, concentración efectiva de exposición, e interacción entre ellos. Más aún, es posible que el efecto de estos DEs en el espermatozoide puede además ser indirecto debido a que su blanco también es en el tracto genital femenino. Es por esto que es importante tener en cuenta estas limitaciones al instante de intentar extrapolar los resultados “*in vitro*” a la situación “*in vivo*”. En esta tesis empleamos concentraciones de estos tóxicos que son similares a aquellas reportadas en fluidos humanos[56-60].

Inicialmente, elegimos la RA por ser un paso clave en el proceso de fecundación y se considera el punto final funcional de la capacitación del espermatozoide[39]. Independiente de algunas excepciones, los espermatozoides de todos los mamíferos deben pasar por este proceso para cruzar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito[39]. De esta forma, la falta de respuesta a los inductores de RA se correlaciona con un mal pronóstico en la FIV humana. En este estudio, mostramos que dos tóxicos ambientales, NP y DEHP indujeron “*in vitro*” la RA en espermatozoides de ratones en concentraciones similares a las encontradas en muestras humanas, lo que sugiere que podrían ejercer un efecto similar “*in vivo*”. Además, mostramos que la RA inducida por NP es

independiente del estado de capacitación de los espermatozoides e implica la activación de los sustratos de PKA, pero no la fosforilación de las proteínas en tirosina.

La RA es un proceso que “*in vitro*” es espontáneo o inducido por diferentes moléculas que se encuentran en el tracto reproductivo femenino como P4, E₂, ATP o zona pelúcida solubilizada[38]. La evidencia experimental “*in vitro*” indica que la estimulación de la RA por inductores fisiológicos solo puede ocurrir en espermatozoides capacitados, al promover un aumento final en la concentración de calcio intracelular [Ca⁺²]_i[54]. Además, la RA puede ser inducida por otras moléculas fisiológicas, que podrían estar en el tracto femenino pero que su participación en este proceso ha sido cuestionada (Ej. Glutamato, dopamina)[328]. La evidencia “*in vitro*” ha mostrado que NP provoca un aumento del [Ca⁺²]_i en diferentes tipos de células, al actuar como un inhibidor de la bomba SERCA en el retículo endoplásmico y canales de calcio abiertos tipo L[329]. Sin embargo, también puede inducir la desestabilización de la membrana plasmática y probablemente de esta manera aumenta la permeabilidad a diferentes moléculas e iones. Por tanto, es posible que el mecanismo por el cual NP induce la RA en espermatozoides de ratón pueda implicar la apertura de canales de calcio o incrementar la permeabilidad del calcio a nivel de la membrana. En este sentido, los DEs son capaces de unirse a CatSper e inducir un aumento del [Ca⁺²]_i y muestran un efecto sinérgico junto a componentes fisiológicos presentes en el fluido oviductal. Por tanto es posible que los DEs podrían interferir en la acción mediada por P4 sobre CatSper y de esta manera afectar el proceso de fecundación “*in vivo*”[330]. En nuestro estudio, la RA inducida por NP y DEHP fue evaluada directamente mediante la técnica de la tinción de CCB, un colorante que en condiciones ácidas se une a aminoácidos básicos, principalmente

arginina, lisina e histidina, presentes en las proteínas que conforman, en este caso, el acrosoma. Los datos presentados en esta tesis fueron realizados con tres técnicas experimentales distintas, por lo que creemos que validan claramente los resultados. Una de las posibles críticas es que dada sus propiedades es posible que los DEs estén actuando simplemente como saponificadores, y de esta manera puedan disolver o perforar las membranas de manera inespecífica. Esta idea podría cobrar más fuerza dado que NP induce la RA aún en condiciones no capacitantes. Sin embargo creemos que este no es el caso, ya que la RA inducida por NP no se detectó en presencia de un inhibidor de la PKA, lo que sugiere que el parámetro experimental observado es fisiológicamente relevante y que ocurre mediante la activación de una vía de señalización intracelular relevante en el espermatozoide. Esta idea se ve reforzada con el resultado que NP aumenta el patrón de fosforilación de sustratos de PKA en relación a aquellos espermatozoides que no están capacitados.

En esta tesis mostramos que NP promueve la fosforilación de Thr-197, un residuo que está involucrado en la activación de PKA y que la fosforilación en Thr 197 de la subunidad catalítica α inducida por NP se evitó mediante el uso del inhibidor de PKA H89. Los resultados sugieren que NP induce vías de señalización intracelular similares en los espermatozoides de ratón que conducen a la RA, idea que se ve reforzada por el hallazgo de que NP tenga un efecto similar a P4 sobre la RA en condiciones capacitantes. Por otro lado, también es posible que NP, active diferentes vías de señalización intracelular a las provocadas por la P4, y que de esta manera NP, se dirija a una población de espermatozoides diferente o aceleren el proceso de capacitación, como se observa cuando NP induce la RA en condiciones no capacitantes, induce la fosforilación de sustratos de PKA, o incrementa los

niveles de pPKA α en condiciones no capacitantes. Estas son preguntas que deben responderse en futuras investigaciones.

Trabajos previos han demostrado que diferentes tóxicos ambientales, incluido el NP, estimulan la capacitación "*in vitro*" de diferentes especies de mamíferos [52]. Aquí, mostramos que ambos compuestos NP y DEHP, dos tipos de tóxicos que formaron parte de esta investigación por su relevancia reconocida como contaminantes ambientales, inducen "*in vitro*" la RA en espermatozoides de ratón y que el efecto de NP es independiente del estado de capacitación y no implica la fosforilación en sustratos de tirosina, lo que sugiere que este parámetro no es un requisito para la RA como se ha sugerido anteriormente. Curiosamente, se ha detectado NP en el líquido folicular humano, lo que sugiere que podría estar presente en el sitio de fecundación en humanos[57]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los dos tóxicos ambientales utilizados en este estudio (NP y DEHP) y probablemente otros que aún no se han probado, podrían afectar la fertilidad "*in vivo*" al cambiar el momento o el sitio anatómico de la RA[332].

12.2. Efecto disruptor crónico de una mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles.

Muchas investigaciones previas sobre los DEs, se han basado en el uso de compuestos individuales con dosis de exposición cercanas o incluso superiores a las definidas como LOAEL, lo que dificulta una predicción real del efecto de la exposición a dosis bajas en humanos. Además, la mayoría de estos estudios se han realizado en una ventana de desarrollo específica, que en realidad, no simula la exposición crónica a las mezclas de DEs que ocurre

durante toda la vida de animales y seres humanos. Para lograr nuestro objetivo, diseñamos un procedimiento experimental para emular la exposición crónica a los DEs ambientales desde la fecundación hasta la edad adulta. Nuestro modelo nos permitió estudiar el impacto de exposición a una mezcla específica de DEs versus el efecto de la exposición a compuestos individuales en la salud reproductiva masculina, que es un paso necesario para comprender la influencia de estos compuestos en el ser humano[295]. Otra diferencia relevante, es que todos los estudios sobre el impacto de DEs en la fertilidad masculina se centran en el testículo y la espermatogénesis, sin considerar el impacto en producto final de este proceso que es el espermatozoide. Dado lo anterior, en nuestra investigación, evaluamos los efectos de esta exposición crónica sobre los espermatozoides. Por otro lado, considerando que nuestra mezcla de compuestos tienen efectos antiandrogénicos y estrogénicos y afectan las vías reguladas por E_2 , estudiamos el transcriptoma de los espermatozoides expuestos y los transcritos más relevantes presentes en el espermatozoide implicados en vía señalización mediada por E_2 y los miRNAs por ser blancos clave de los DEs[253].

Primeramente, caracterizamos el efecto disruptor de estos tóxicos usando parámetros fisiológicos relevantes y que previamente se han usado para este mismo propósito. En relación a ello, los enfoques epidemiológicos sugieren que el peso al nacer está inversamente asociado con la exposición a diferentes DEs. En este punto, nuestro estudio determinó que la exposición crónica esta mezcla tenía un efecto obesogénico en ratones machos durante su desarrollo, hasta el destete (21 días de vida), que no se mantenía al llegar a la adultez. Es interesante este resultado, si consideramos un estudio paralelo realizado en nuestro laboratorio en las mismas condiciones experimentales pero con las hembras, no se

observaron cambios en el peso corporal durante ninguna etapa del desarrollo[13]. Al respecto, podemos comentar que hay investigaciones que sugieren una relación efecto sexo-dependiente de estos tóxicos en procesos metabólicos y del desarrollo[331]. En cuanto a ello, se ha señalado que los DEs pueden alterar la homeostasis de los lípidos aumentando el número y el tamaño de los adipocitos induciendo vías de señalización que implican al receptor de peroxisoma proliferador activado (PPAR), a los receptores de estrógeno y a mecanismos moleculares relacionados con la regulación del peso corporal[332].

En ese sentido, hay que considerar que la regulación de la distribución y composición de la grasa corporal es mediada por el E₂ en las hembras y por la testosterona en los machos[333]. En los ratones expuestos observamos un desbalance entre ambas hormonas, donde predomina E₂, lo que podría explicar un incremento del peso y probablemente un cambio de distribución de la grasa corporal. Por otro lado, que el incremento de peso no se mantenga en el tiempo concuerda con estudios que señalan que algunos ftalatos, los compuestos en mayor proporción de la mezcla, tienen un efecto obesogénico relacionado con la etapa del ciclo vital en que ocurre la exposición. En nuestro caso, los efectos obesogénicos fueron mayores durante la lactancia y pueden haber disminuido una vez que la maquinaria enzimática y la producción de hormonas androgénicas de los ratones en desarrollo les permitió metabolizar con mayor eficiencia la mezcla de DEs, sin la influencia hormonal o la dependencia de la maquinaria metabólica materna. Es relevante mencionar, que el miRNA 143, que está sobre expresado en el RNA de espermatozoide de ratones expuestos, tiene como función biológica la regulación positiva del desarrollo del tejido adiposo y del metabolismo de la glucosa, sugiriendo una relación entre la desregulación de miRNAs inducida por DEs y el efecto

observado. Desde el punto de vista reproductivo, la pérdida de equilibrio en las hormonas testosterona y estradiol, es una de las causas de insuficiencia espermatogénica primaria relacionada con daño testicular y de las células germinales. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la exposición crónica a DBP disminuye los niveles de testosterona intratesticular. Aquí, mostramos que la exposición crónica a la mezcla de ftalatos y alquilfenoles induce una disminución en los niveles de testosterona plasmática, que está en concordancia estudios previos, y sin que se modifiquen los niveles de E₂. Sobre eso, un estudio previo en otro laboratorio, indica un efecto antagónico en los niveles de hormonas reproductivas en el suero de ratas macho pre púberes expuestas a una mezcla binaria de NP/DBP[172]. Por otro lado, nuestros resultados muestran un incremento del transcrito y de los niveles proteicos de *Cyp19a1* (aromatasa) en los espermatozoides de ratones expuestos, que difiere con lo observado previamente en testículo en nuestro laboratorio. Una explicación de para estas diferencias puede ser que el aumento de expresión de *Cyp19a1* en células germinales y probablemente en el tejido adiposo, sea un mecanismo compensatorio a la alteración que se observa en el testículo de ratones expuestos.

12.3. Efecto disruptor crónico de una mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles en la capacidad de fecundar de los espermatozoides.

En cuanto a la capacidad de fecundar de los espermatozoides de los ratones expuestos, los resultados confirman los de estudios previos que señalan que la exposición a DEs disminuye la producción de espermatozoides[334]. Otros estudios usando ftalatos o una mezcla similar a la nuestra, evidenciaron múltiples alteraciones histológicas y de la morfología testicular,

incremento en la apoptosis de células germinales, disrupción en la funcionalidad de las células de Leydig, y disminución en la cantidad y funcionalidad de los espermatozoides[11]. En cuanto a los parámetros más directamente relacionados con la capacidad de fecundar, observamos que no hay diferencias en el porcentaje de RA espontánea entre los espermatozoides de ratones expuestos y los de ratones vehículo. Sobre esto, la RA espontánea es la ocurrencia de la exocitosis sin un inductor y se relaciona con una disminución de la eficiencia de la fecundación y con un decline en la calidad espermática. Por otro lado, nuestros resultados mostraron que la RA inducida por P4 (inductor fisiológico) se ve significativamente incrementada en los espermatozoides de ratones expuestos que dado el resultado previo en cuanto a la RA espontánea, nos permitió descartar que esos espermatozoides presenten alguna desestabilización de su membrana. Desde otro punto de vista, si consideramos los cambios en el transcriptoma de estos espermatozoides, podríamos hipotetizar que los espermatozoides expuestos podrían tener una expresión mayor de canales de calcio sensibles a P4, como los CatSper, un mayor número de receptores esteroidales, una distribución celular diferente o un cambio en la afinidad de canales iónicos o receptores, como se ha descrito en la literatura. Aunque pueda parecer contradictorio, en los espermatozoides expuestos, el porcentaje de FIV evaluada por la generación de embriones de dos células, se vio disminuida. Pero si consideramos que la fecundación es un proceso biológico con varias etapas secuenciales, los resultados sugirieron que la disminución en el porcentaje de FIV probablemente se relacionó con la RA, sino que con eventos posteriores a esto. Una vez que ha ocurrido la fusión de los gametos, la cabeza del espermatozoide, que contiene el núcleo compuesto por DNA compacto, ingresa al ovocito e induce oscilaciones de Ca^{+2} que desencadenan vías de señalización relevantes para la fecundación. Luego, ocurre la

decondensación del núcleo del espermatozoide y la progresiva evolución al estado de pronúcleo, que implica el intercambio de las protaminas por las histonas del ovocito, la incorporación de otras proteínas acompañantes la síntesis de DNA y el reclutamiento de los RNA del ovocito. En relación a ello, las protaminas son responsables de la densidad y estabilidad del DNA del espermatozoide. Múltiples estudios muestran la relevancia del balance histonas/protaminas y entre protamina 1/protamina 2, así como su desbalance, se relaciona fuertemente con una disminución de la espermatogénesis, alteraciones en la motilidad y daño en el DNA del espermatozoide, pérdida de embriones pre implantacionales con una evidente relación con la infertilidad masculina[335]. Por ello, un resultado relevante de nuestro estudio que se puede relacionar con la disminución del porcentaje de FIV, es que en los espermatozoides expuestos hay una sobre expresión del gen que codifica a la histona (*H2ba*) y una sub expresión del gen que codifica a la protamina 2 (*Prm2*) indicando una desregulación de la razón entre ambas proteínas. De igual forma y en relación a la disminución del porcentaje de FIV, otro hallazgo interesante en este estudio, es que encontramos una sobreexpresión del miRNA 34c en espermatozoides de los ratones tratados con la mezcla, el cual se ha mostrado que es llevado por el espermatozoide y es importante durante la primera división del cigoto, por lo que la desregulación en este miRNA tal vez podría explicar en parte los resultados obtenidos[336].

12.4. Efecto disruptor crónico de una mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles en la cantidad, perfil y contenido de RNA de los espermatozoides.

La preservación de los mRNA de los espermatozoides comienza en las primeras etapas de la espermatogénesis. Los estudios realizados en los últimos años han demostrado que hay diferentes tipos de mRNA presentes en los espermatozoides humanos, tales como los que codifican para los canales de calcio tipo L, los receptores de estrógeno y progesterona, etc . En cuanto a la función de estos transcritos, ensayos muestran la presencia de transcritos presentes solo en el espermatozoide en embiones de chanco en diferentes estadios del desarrollo y no en los ovocitos sin fecundar, así como, en otra relevante investigación los ensayos de penetración ovocito de hámster por espermatozoides humanos mostraron que solo se detectan protamina-2 y clusterina en espermatozoides y cigotos, pero no en ovocitos de hámster sin fecundar[68, 337]. Estas investigaciones, así como otras posteriores, sugieren que RNAs provenientes del el espermatozoide podrían desempeñar un papel en la embriogénesis temprana y ser funcionalmente importantes[338].

En este estudio mostramos por primera vez que en espermatozoides de ratones expuestos crónicamente a dosis bajas de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles, desde una etapa embrionaria temprana hasta la edad adulta, hay alteraciones en el RNA y particularmente una desregulación de la expresión de miRNAs.

Uno de los grandes desafíos de este trabajo fue estandarizar una técnica de extracción de RNA sin contaminación con células somáticas y DNA para lo cual pasamos por varias etapas con la ayuda de la limitada información al respecto. Luego de estandarizar una técnica confiable para ello, analizamos la concentración y el perfil electroforético de los

espermatozoides de ratones control (V) y en forma relevante, nuestros resultados coincidieron con estudios previos que muestran una concentración de RNA que es el 1% respecto de una célula somática y la complejidad de la población de RNA de espermatozoide que comprende en forma más abundante a los rRNA, gran cantidad de RNAs pequeños no codificantes (miRNAs, piRNAs, tRNAs) y long non coding RNAs de más de 200 pb y finalmente mRNAs. Al comparar este perfil caracterizado previamente y en concordancia con los espermatozoides control, sorprendentemente, pudimos observar un perfil significativamente diferente en las muestras de RNA de espermatozoides de ratones expuestos cuya concentración de RNA era mayor, cuyo perfil electroforético difería de los espermatozoides control, destacándose un aplanamiento de la curva de los RNA entre 100 y 2000 nt. Esto fue concordante con los análisis bioinformáticos que nos mostraron una distribución de RNAs donde priman los mRNAs (43%) y una distribución completamente opuesta en cuanto a los rRNAs (0,75%) que es la población predominante descrita en espermatozoide en otras investigaciones, al igual que en nuestros espermatozoides control (39%), pero si lo relacionamos con la alteración de la maquinaria de degradación post transcripcional por desregulación de transcritos relevantes (*Ago2* y *Dgcr8*, entre otros), nos sugieren una relación entre ambas observaciones. Otro hallazgo destacable sobre el RNA de espermatozoides expuestos, fue la presencia y migración de bandas que han sido históricamente caracterizadas en células somáticas, como las subunidades ribosomales 18S (2000 nt) y como la subunidad 28S (4000 nt), presentes habitualmente en el citoplasma. Sobre el particular, y considerando que el espermatozoide contiene muy baja cantidad de citoplasma, lo primero que pensamos es que se trataba de RNA contaminado por células somáticas, pero lo descartamos dado que la técnica de extracción de RNA fue exactamente

la misma entre ambos grupos, las replicas de cada uno de ellos son muy similares entre sí y significativamente diferentes entre los espermatozoides experimentales y los control y la presencia de transcritos control en ambos grupos. En este aspecto, un estudio exhaustivo en el que se estandarizó la técnica de extracción de RNA de espermatozoides de alta pureza, usando 33 diferentes muestras de semen, mostró que en aquellas muestras de semen de hombres con alteraciones morfológicas de los espermatozoides, analizadas mediante microscopía electrónica e inmunohistoquímica, observaron un incremento de citoplasma entre la cabeza y cuello del espermatozoide y estructuras sugerentes de la presencia subunidad 18S y 28S, pero no de las otras proteínas que componen el ribosoma, por tanto transcripcionalmente inactivos, sugiriendonos en nuestro caso, que los espermatozoides expuestos hayan tenido mayor cantidad de citoplasma retenido en la zona de cabeza y cuello, lo que cuadra con la significativa mayor cantidad de mRNA observada, en relación a espermatozoides control[339].

Al realizar diferentes análisis globales de expresión diferencial de genes, pudimos observar diferencias significativas en la expresión de genes entre los espermatozoides experimentales y los espermatozoides control, donde encontramos genes sobre expresados y sub expresados que tenían un impacto en procesos biológicos relevantes, destacándose los relacionados con la generación de miRNAs y con su regulación post transcripcional. Estos resultados son concordante con dos estudios realizados en nuestro laboratorio. El primero se realizó en iguales condiciones experimentales, pero con las hembras y se observó en ovarios, la desregulación de la expresión de genes pertenecientes a la maquinaria de biogénesis de miRNAs, alteraciones en la expresión de Pre-miRNAs y miRNAs que afectan

principalmente, procesos biológicos del desarrollo de la fisiología reproductiva femenina [12]. El otro estudio se realizó en condiciones experimentales similares con testículos de ratones expuestos y de igual forma mostró una desregulación de genes implicados en la biogénesis de miRNAs, relacionado con alteraciones de la función reproductiva masculina, que nos sugieren un mecanismo común de disrupción mediada por DEs que implica desregulación de la biogénesis de miRNAs que tiene un impacto negativo sobre los procesos reproductivos masculinos y femeninos observados en tres tejidos y células diferentes: ovarios, testículos y el espermatozoide[253].

De igual manera, pudimos advertir la desregulación de miRNAs muy relevantes para el desarrollo de la espermatogénesis como es la familia 34/449. En total observamos cuatro miRNAs sobre expresados (34a, 449c, 449e, 34c) y uno sub expresado (34b). Los miembros de esta familia de miRNAs, están ubicados como clusters en cromosomas específicos, son altamente co-expresados en el testículo, tienen características comunes y funciones redundantes. Su función principal en diferentes tipos celulares es la modulación de procesos implicados en el ciclo celular, diferenciación y funcionalidad. En el caso específico del testículo, la espermatogénesis y el espermatozoide, existe creciente evidencia que señala que la familia 34/499 regula la funcionalidad del testículo, la espermatogénesis y la formación del espermatozoide maduro y que el grado de su desregulación se relaciona con el grado de severidad de infertilidad masculina[228]. La mayoría de las investigaciones al respecto, señalan que la subexpresión de esta familia induce daños severos en el testículo e infertilidad, lo que se confirma con la generación de ratones ratones KO. En un significativo estudio, los autores generaron ratones doble KO condicional del clúster miRNA-34 y miRNA-449

específicos para células espermatogénicas y células multiciliadas. Los datos demostraron que en ausencia de la familia 34/449, las células espermatogénicas no se vieron afectadas y los ratones eran totalmente fértiles. Por el contrario, los ratones KO en células multiciliadas eran infértiles y presentaban atrofia testicular. Además, estos ratones exhibían ciliogénesis alterada de los conductos eferentes debido a la desregulación de varios genes que contribuyen en ella[340]. Para nosotros fueron significativos esos resultados, si consideramos que los espermatozoides representan un tipo muy diferenciado de células ciliadas, por el contrario, en nuestro caso la mayoría de los miRNAs de este clúster estaban sobre expresados. En relación a ello, estudios muestran que la inducción de estrés oxidativo en el testículo de ratón causa una sobre expresión de miRNA 34 a y posteriormente, el tejido testicular exhibe una alta expresión de marcadores apoptóticos y un alto índice apoptótico en las células germinales masculinas sugiriendo que el estrés oxidativo es una de las mayores causas de infertilidad masculina y que los miembros de la familia 34/449 tienen una función anti oxidante y antiapoptótica vital para la homeostásis testicular[341]. Por tanto, sobrerregulación de esta familia observada después del estrés oxidativo sugiere que este clúster de miRNAs asegura la mantención de la espermatogénesis cuando se altera la homeostásis del testículo. Desde ese punto de vista, nuestras observaciones sugieren que la sobrerregulación de la familia 34/449 en los espermatozoides de ratones tratados son el reflejo de un ambiente testicular comprometido inducido por la exposición crónica a la mezcla de DEs.

12.5. Efecto disruptor crónico de una mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles sobre la expresión de *Cyp19a1* y *Erβ* en espermatozoides.

En parte final de nuestro estudio y como parte de una trilogía de investigaciones paralelas generadas en nuestro laboratorio donde evaluamos el efecto disruptor sobre tejidos y células sensibles a la regulación hormonal mediada por E₂ que forman parte del sistema reproductor femenino y masculino, mediada por la vía modulada por E₂. En nuestro caso, estudiamos los niveles de expresión de transcritos y de proteínas de una enzima relevante en la regulación del balance T/E₂ en el testículo, *Cyp19a1*, del receptor de E₂, *Erβ* implicado en la señalización de esta hormona y de algunos miRNAs que predijimos previamente que los tenían como blanco y que están presentes en espermatozoides. Revisando la literatura al respecto, nuestros resultados fueron concordantes con investigaciones que mostraron que células MCF7 (línea celular derivada de cáncer mamario), altamente sensibles al efecto de E₂, al ser expuestas a dosis ambientalmente relevantes de una mezcla de DEs, similar a la nuestra, presentan una sobre expresión, un aumento de la actividad de aromatasa y también un aumento en la biosíntesis de E₂. De igual forma, los resultados de esta investigación y los de nuestro laboratorio, son similares a otro estudio en que se estandarizó el ensayo con Luciferasa para determinar el efecto de los DEs sobre la expresión de aromatasa, la producción de E₂ y de receptores de estrógeno[342]. Esta investigación señaló que los DEs pueden actuar como agonistas o antagonistas en relación a la expresión y actividad de ambos transcritos, lo que es concordante con lo encontrado en nuestras tres investigaciones en donde en testículo y en ovarios de ratones expuestos a la mezcla se observó una disminución de la expresión de *Cyp19a1* y una disminución en la producción de E₂ en las hembras, lo que podía significar

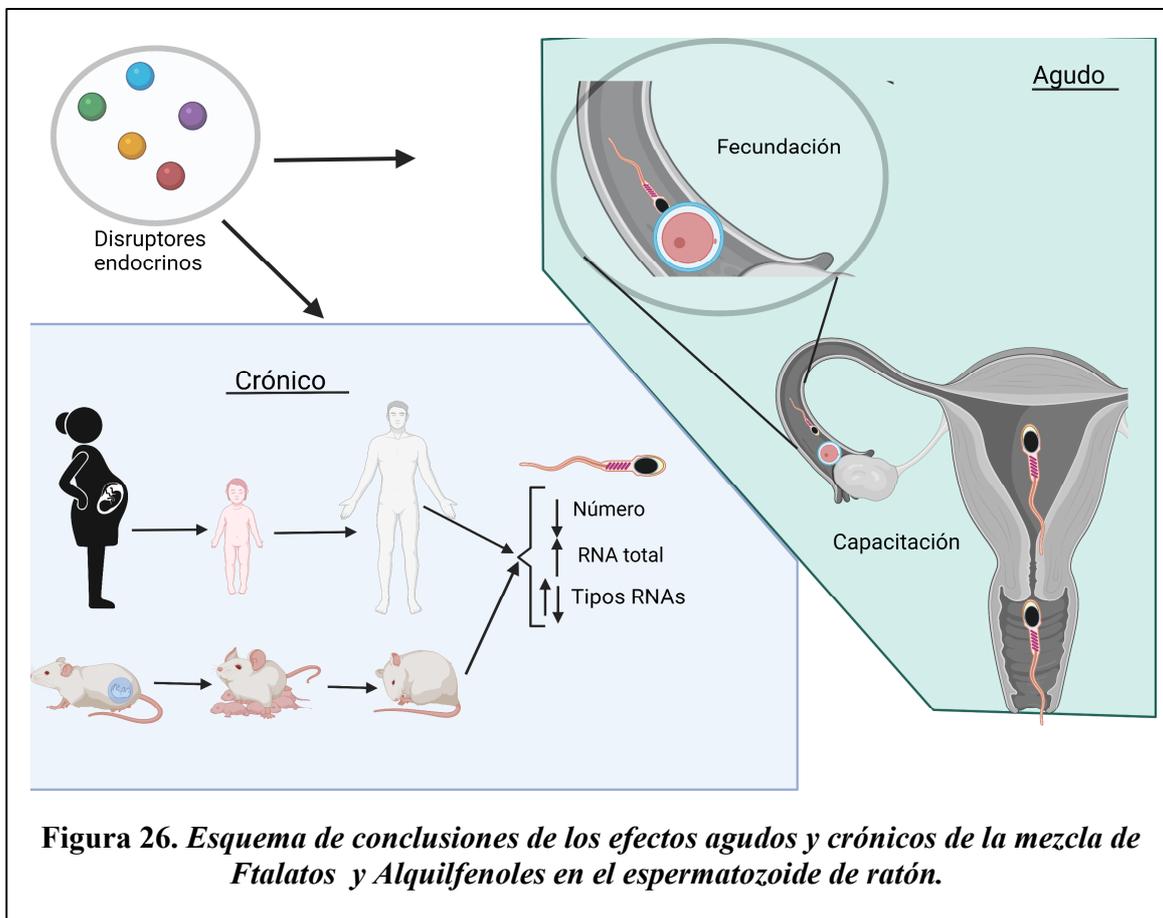
una expresión diferencial de los efectos de la mezcla y probable mecanismo compensatorio en las células germinales, como en nuestro caso, difícil de detectar en el tejido completo. En relación a la regulación mediada por miRNAs, en los espermatozoides, observamos una sub expresión de los Pre-miRNAs precursores de los miRNAs que tienen como blanco los transcritos estudiados. Si bien hay que considerar que pueden ocurrir cambios en el proceso final de la biogénesis de miRNAs que hacen que la expresión de Pre-miRNAs no refleje directamente lo sucedido a nivel de miRNAs, un resultado destacable y coherente utilizando RNAseq en los espermatozoides de ratones expuestos, fue que nuestros resultados mostraron una sub expresión significativa de, al menos, dos miRNAs 200b y 7b, que fueron estudiados a través de sus precursores primarios que encontramos subexpresados y que tienen como blanco a predicho a *Cyp19a1* y *Erβ*. Más aún, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio en que se analizó la desregulación generada por la misma mezcla en ovario de ratón, se validaron los resultados in silico sobre el miRNA 200b, transfectando células de la granulosa, las células somáticas que rodean al ovocito que producen y secretan E₂, con un agonista de miRNA 200b (agomiR 200b) que imita la acción del miRNA 200b y se observó una disminución de los niveles de mRNA *Cyp19a1*, de su proteína y de la producción de E₂. Por otro lado, en los mismos experimentos al usar un antagomiR, es decir un antagonista de miRNA 200b, se observaron los resultados opuestos sugiriendo fuertemente que miRNA 200b regula la expresión de *Cyp19a1* en células del ovario y muy probablemente en otros tipos celulares [12].

13. CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis muestran que los disruptores endocrinos tienen un impacto agudo y crónico sobre la función del espermatozoide. Los resultados obtenidos mostraron que, a un nivel de exposición crónico en un modelo murino, la exposición de una mezcla de ftalatos y alquilfenoles afecta tanto la producción de espermatozoides, como el contenido y tipos de RNAs presentes en estas células. De igual forma, el efecto crónico de la exposición a estos compuestos en nuestro modelo murino mostró como uno de los hallazgos más relevantes, una significativa desregulación de mRNAs y miRNAs muy determinantes en la generación del espermatozoide que podrían explicar, en parte, algunos tipos de infertilidad masculina (Figura 26). Estos resultados permiten inferir que es posible que, la exposición crónica de estos y otros disruptores endocrinos, en seres humanos puedan tener estos y quizás otros efectos que tengan un impacto importante en la capacidad fecundante del espermatozoide (Figura 26). Un dato adicional que se obtuvo en esta tesis es que la exposición crónica de esta mezcla de disruptores endocrinos también afectó a la tasa de fecundación, por lo que es posible que, en el caso humano, la sola exposición en el hombre podría afectar a la fertilidad. Esto es aún más relevante ya que los últimos datos en la literatura apuntan a que los RNAs contenidos en el espermatozoides participan activamente en las etapas tempranas de la activación del ovocito y desarrollo embrionario pre-implantacional.

Por otro lado, se ha determinado la presencia de disruptores endocrinos en el tracto genital femenino, por lo que estos podrían tener una acción directa y aguda al momento de la fecundación. Usando un modelo murino “*in vitro*”, en esta tesis, observamos que,

efectivamente, al menos uno de ellos (nonilfenol) afecta los eventos de capacitación y reacción del acrosoma, que son etapas fundamentales que el espermatozoides, tanto de ratón como el humano deben experimentar para lograr fecundar al ovocito (Figura 26). Estos resultados, igual que los anteriores permiten proponer que algo similar pudiese estar pasando en el tracto genital de la mujer.



14. PROYECCIONES

De acuerdo a los resultados y conclusiones de esta tesis, a continuación se detallan las siguientes proyecciones.

14.1 Dentro de los miRNAs desregulados por la mezcla de ftalatos y alquilfenoles, se encuentra la familia 34/499, que dada su relevante participación en los procesos que originan espermatozoides, su presencia y estabilidad en el semen y espermatozoide, podría emplearse como un biomarcador de infertilidad.

14.2 Dado que la información sugiere que los miRNAs transferidos por el espermatozoide regulan algunos aspectos de la embriogénesis, sería importante ver si los miRNAs que se desregulan tienen un impacto en el desarrollo del embrión.

14.3 Otra investigación relevante para evaluar esta información en humanos, sería ver los niveles de RNA en los espermatozoides y los niveles de los compuestos estudiados en la tesis, en el semen y espermatozoides de pacientes infértiles con sospecha de exposición crónica (Ej: exposición ocupacional).

14.4 Es importante continuar la exposición crónica en la F2 y F3 evaluando parámetros reproductivos y mecanismos de regulación epigenética en el espermatozoide.

14.5 Para una aplicación terapéutica, una posibilidad sería transfectar células germinales para sobreexpresar miRNAs relevantes para la generación de espermatozoides y luego realizar experimentos con antagoMir que revierten la sobreexpresión, estudiar las consecuencias biológicas y generar un posible tratamiento con antagoMir con nanotecnología dirigida específicamente al testículo y células germinales.

15. ANEXO

15.1. Experimentos Suplementarios.

Como una aproximación experimental adicional, se una exposición aguda a ftalatos y alquilfenoles “*in vitro*” con la línea celular GC-2. Esta es una línea de células germinales proveniente de células germinales de ratón que, dependiendo de las condiciones de cultivo, deriva en espermatoцитos o espermátidas[343]. Nuestro objetivo fue investigar si el efecto crónico de la mezcla de ftalatos y alquilfenoles “*in vitro*” modifica los niveles de expresión de *Cyp19a1* y *Erβ* y de los microRNAs que los modula. La ventaja metodológica es que sería similar a una exposición solamente a las células germinales, asilando de alguna manera de todo el resto del componente endocrino y paracrino que se encuentra en un modelo “*in vivo*”.

En este caso, las células fueron cultivadas y expuestas a dos concentraciones distintas de la misma mezcla de ftalatos y alquilfenoles que ya se habían usado anteriormente en los experimentos “*in vivo*” (Figura 27, Tabla 9).

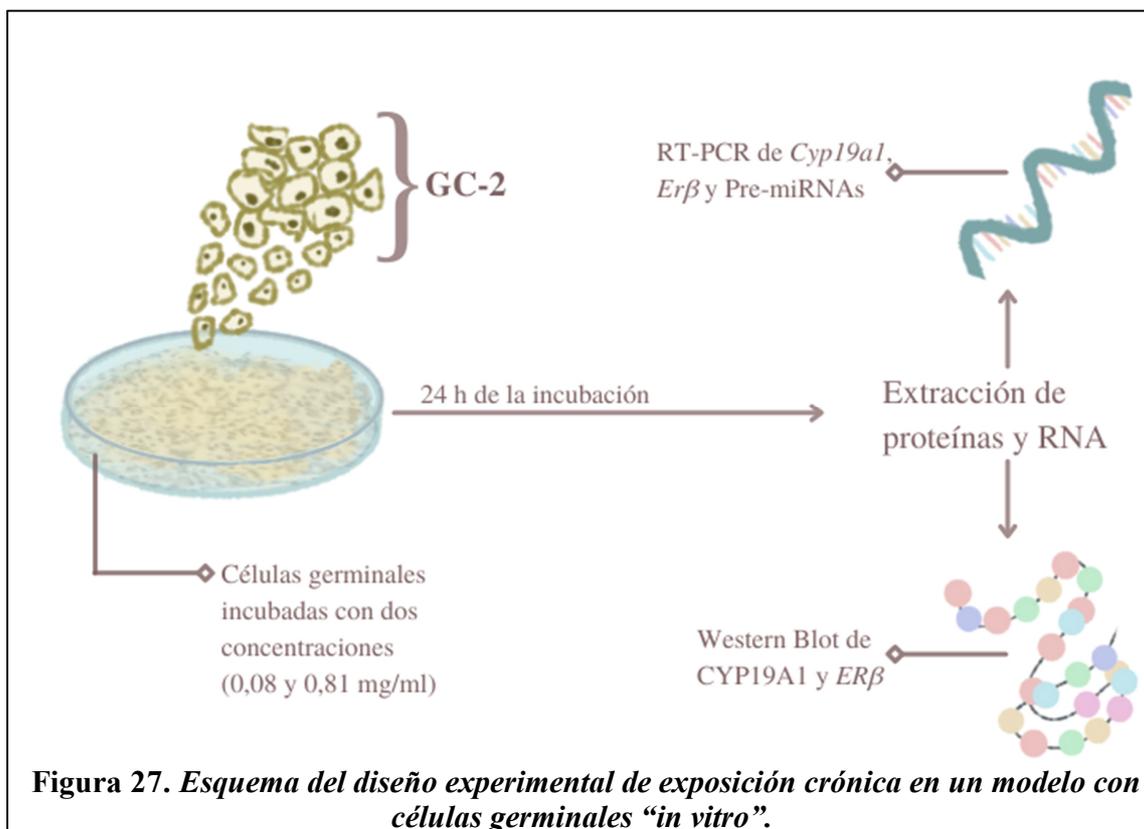


Tabla 9. Descripción de las dos dosis de tratamientos con la mezcla de ftalatos y alquilfenoles a las GC-2.

<i>Disruptor</i>	A Dosis 1	B Dosis 2	C Vehículo
DEHP	0,024 mg/ml	0,24 mg/ml	DMSO
DBP	0,024 mg/ml	0,24 mg/ml	DMSO
BBP	0,024 mg/ml	0,24 mg/ml	DMSO
NP	0,004 mg/ml	0,04 mg/ml	Etanol
OP	0,004 mg/ml	0,04 mg/ml	Etanol
Dosis Total	0,081 mg/ml	0,81 mg/ml	-

15.2. Materiales y Métodos de los resultados suplementarios.

15.2.1. Línea celular e incubación con la mezcla de Ftalatos y Alquilfenoles.

La línea celular derivada de espermatoцитos en paquiteno GC-2, se cultivó en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS (suero bovino fetal) y 10% de antibiótico-antimicótico (100X), pH 7,2 a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, para los experimentos de incubación con la mezcla, se cultivaron 5×10^5 células / pocillo en placas Petri de seis pocillos (diámetro 35 mm) en una incubadora a 37 °C, 21% O₂ y 5% CO₂. Las células GC-2 fueron incubadas por durante 24 h con dos dosis de la mezcla de 0,081 o 0,81 mg/ml (Tabla 2) que es equivalente a los niveles de cada uno de los compuestos encontrados en testículo y en orina de humanos (1,6 - 5,6 μM de ftalatos y 0,038-1,25 μM de alquilfenoles). Posteriormente, las células se recuperaron para *Western Blot* y RT-PCR.

15.3. Determinación de los niveles proteicos de CYP19A1 y ERβ en la línea GC-2.

En el caso de la línea celular los *pellets* se re suspendieron en 50 μl de tampón de lisis RIPA, con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se incubaron por 1 h a 4 °C y luego se sonicaron (Branson sonifier 150, Merck®). Los componentes insolubles se removieron por centrifugación a 1,500 g por 10 min. El sobrenadante se aisló y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford, usando como patrón estándar una solución de BSA en diferentes concentraciones (1,34 μg/μl). Las alícuotas de proteínas, se

cargaron en cada línea de un gel de acrilamida al 10% y se sometieron a electroforesis. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Immuno-Blot PVDF Membrane, BioRad, Richmond, CA, USA) utilizando un aparato de electrotransferencia. Las membranas se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo y luego se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos para CYP19A1, ER β , en diluciones de 1:1000, 1:2500, respectivamente y como control de carga β -Actina en dilución de 1:5000 (Tabla 7). Finalmente, se llevó a cabo una segunda incubación con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante en una solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa se detectó mediante una quimioluminiscencia mejorada (Pierce Biotecnología, Rockford, IL).

15.3.1. Extracción de RNA y PCR para determinar niveles de Cyp19a1, Er β y Pre-miRNAs en la línea GC-2.

Para la extracción de RNA total de las GC-2 se empleó el reactivo TRIzol. Una vez aislado, el RNA se trató con 1 μ l (2 U/ μ l) por cada 10 μ g de RNA de rDNaseI.

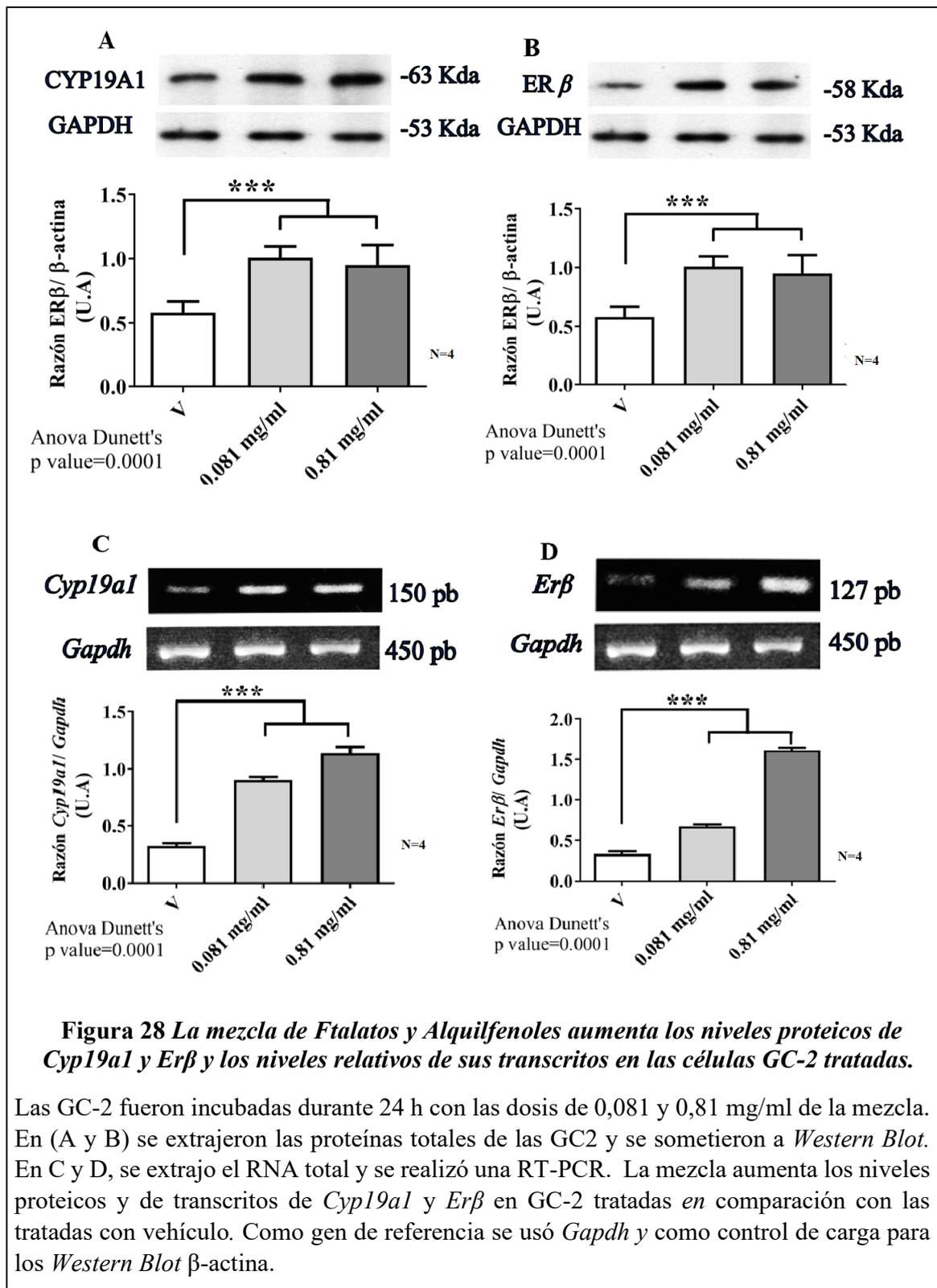
La concentración e integridad de RNA fue determinada con un Espectofotómetro Thermo Scientific Nanodrop 2000. El cDNA de los genes y del precursor primario (Pri-miRNA) se sintetizó a partir de 1 μ g de RNA por RT Master Mix y cebadores aleatorios. Para la PCR semicuantitativa en GC-2 se utilizó el protocolo descrito para la Taq polimerasa de Invitrogen. Las secuencias de cebadores para mRNAs y Pre-miRNAs se diseñaron en base a

la literatura, usando los programas provistos por IDT®, Oligo Analyzer y PubMed Nucleotides. El tamaño de los productos se verificó por electroforesis en gel de agarosa, utilizando como gen endógeno de referencia *Gapdh*. Para verificar la presencia de cDNA como control interno se utilizó el método descrito por Livack KJ [310].

15.3.2. Resultados Suplementarios.

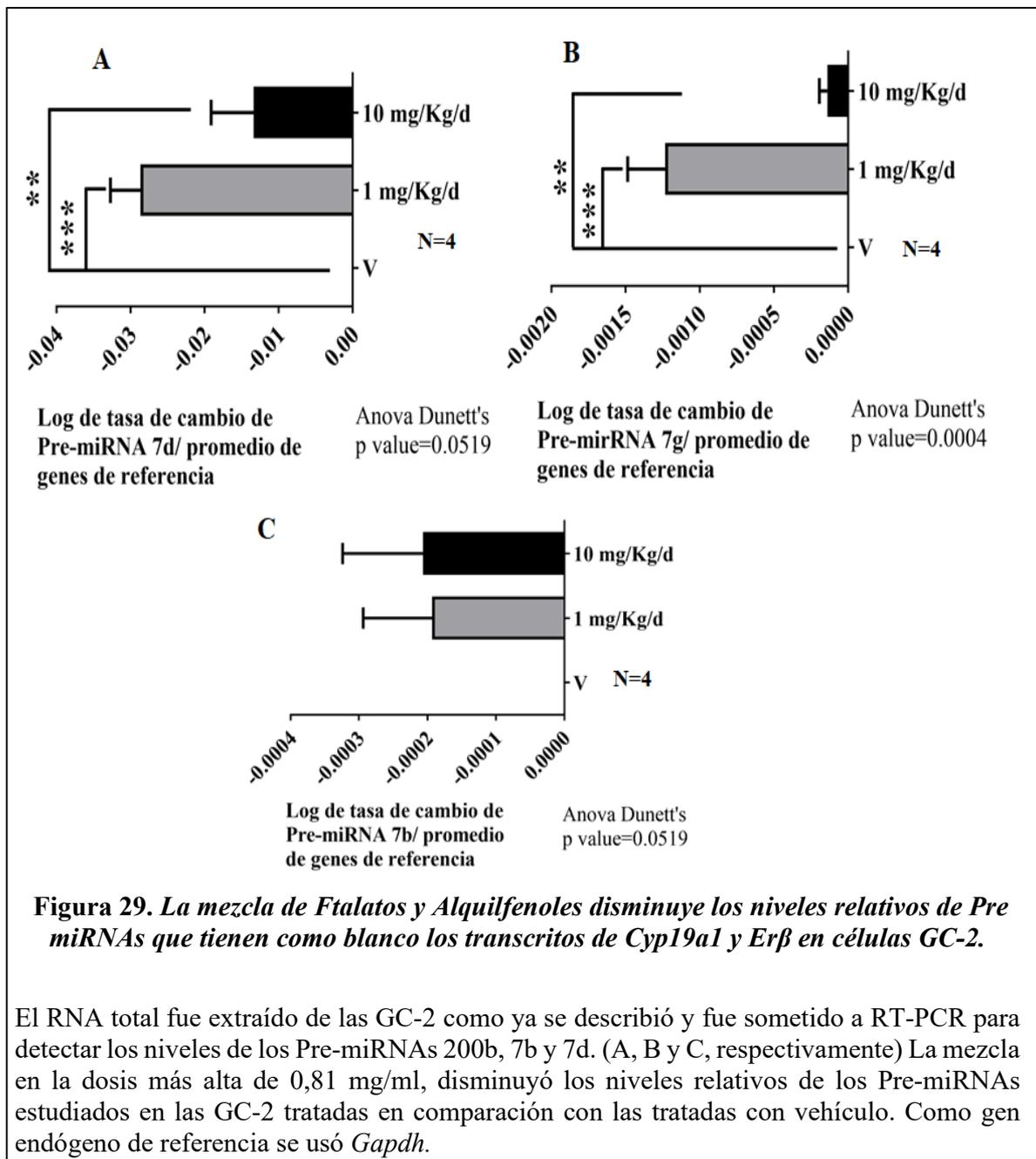
De acuerdo a la literatura tanto *Cyp19a1* como *Erβ*, están presentes en espermatocitos y espermátidas. Aun así, inicialmente confirmamos la presencia de ambos genes en la línea celular mediante PCR. Posteriormente, la línea celular se trató durante 24 h con la mezcla de ftalatos y alquilfenoles en concentraciones equivalentes a las encontradas en orina y testículo humano. Luego del tratamiento, se determinaron los niveles proteicos y de mRNA de *Cyp19a1* y *Erβ* mediante *Western Blot* y PCR, respectivamente. Como control de carga para las PCR se empleó *Gapdh* para los mensajeros y como control de carga para *Western Blot* se empleó β-actina (Figura 27).

Los resultados mostraron que, luego de una incubación por 24 h a una concentración de 0,81 y 0,081 mg/ml hubo un aumento en los niveles de *Cyp19a1* y *Erβ*, tanto a nivel del mensajero como de su proteína (Figura 28).



Bajo estas mismas condiciones se evaluaron los niveles de los precursores de tres miRNAs: Pre-miRNA 200c, Pre-miRNA 7b y Pre-miRNA (Figura 29). Los resultados mostraron que los niveles del Pre-miRNA 200c disminuyeron en las células GC-2 tratadas con ambas concentraciones de la mezcla (Figura 29A). el Pre-miRNA7b disminuyó solo en las células tratadas con la mezcla a 0,81mg/ml, pero no tuvo cambios con la de menor concentración (Figura 29B). De manera interesante, lo contrario ocurrió con el Pre-miRNA 7d, el que aumentó significativamente solo con la mezcla mayor (Figura 29C).

En conjunto, estos resultados sugieren que, los ftalatos y alquilfenoles, desregulan los miRNA, y en particular aquellos involucrados en la regulación génica del receptor de estrógenos. Esto podría tener un impacto en la fisiología reproductiva humana y animal.



16. REFERENCIAS

1. Bartolo, A., et al., *Psychological Adjustment of Infertile Men Undergoing Fertility Treatments: An Association With Sperm Parameters*. Arch Psychiatr Nurs, 2016. **30**(5): p. 521-6.
2. Ben Shlomo, S., et al., *Mental health of women entering fertility treatment: What role do age and internal resources play?* Stress Health, 2017. **33**(4): p. 470-476.
3. Rouchou, B., *Consequences of infertility in developing countries*. Perspect Public Health, 2013. **133**(3): p. 174-9.
4. Agarwal, A., et al., *Male infertility*. Lancet, 2021. **397**(10271): p. 319-333.
5. Levine, H., et al., *Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis*. Hum Reprod Update, 2017. **23**(6): p. 646-659.
6. Agarwal, A., et al., *Male oxidative stress infertility (MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility*. The world journal of men's health, 2019. **37**(3): p. 296-312.
7. Gunes, S., et al., *The role of epigenetics in idiopathic male infertility*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2016. **33**(5): p. 553-569.
8. Direkvand-Moghadam, A., K. Sayehmiri, and A. Delpisheh, *The global trend of infertility: an original review and meta-analysis*. International Journal of Epidemiologic Research, 2014. **1**(1): p. 35-43.
9. Boedt, T., et al., *Preconception lifestyle advice for people with infertility*. Cochrane Database Syst Rev, 2021. **4**: p. CD008189.
10. La Merrill, M.A., et al., *Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification*. Nat Rev Endocrinol, 2020. **16**(1): p. 45-57.
11. Bunay, J., et al., *Combined proteomic and miRNome analyses of mouse testis exposed to an endocrine disruptors chemicals mixture reveals altered toxicological pathways involved in male infertility*. Mol Hum Reprod, 2019. **25**(3): p. 156-169.
12. Patino-Garcia, D., et al., *Daily exposure to phthalates and alkylphenols alters miR biogenesis and expression in mice ovaries*. J Mol Endocrinol, 2020. **65**(4): p. 175-186.
13. Patino-Garcia, D., et al., *Reproductive Alterations in Chronically Exposed Female Mice to Environmentally Relevant Doses of a Mixture of Phthalates and Alkylphenols*. Endocrinology, 2018. **159**(2): p. 1050-1061.
14. Bonde, J.P., et al., *The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2016. **23**(1): p. 104-125.

15. Morin, E.L., et al., *Profiling nonhuman primate germline RNA to understand the legacy of early life stress*. J Exp Zool A Ecol Integr Physiol, 2021.
16. Chen, Q., W. Yan, and E. Duan, *Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(12): p. 733-743.
17. Zhang, Y., et al., *Sperm RNA code programmes the metabolic health of offspring*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(8): p. 489-498.
18. Walker, W.H., *Regulation of mammalian spermatogenesis by miRNAs*. Semin Cell Dev Biol, 2021.
19. Neto, F.T., et al., *Spermatogenesis in humans and its affecting factors*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **59**: p. 10-26.
20. Nixon, B., et al., *Molecular insights into the divergence and diversity of post-testicular maturation strategies*. Mol Cell Endocrinol, 2020. **517**: p. 110955.
21. Korneev, D., et al., *New Insights Into Sperm Ultrastructure Through Enhanced Scanning Electron Microscopy*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 672592.
22. Austin, C.R., *The capacitation of the mammalian sperm*. Nature, 1952. **170**(4321): p. 326.
23. Chang, M.C., *Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes*. Nature, 1951. **168**(4277): p. 697-8.
24. Mahe, C., et al., *Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviductdagger*. Biol Reprod, 2021. **105**(2): p. 317-331.
25. Visconti, P.E., *Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(3): p. 667-8.
26. Taraschi, A., et al., *Two-Player Game in a Complex Landscape: 26S Proteasome, PKA, and Intracellular Calcium Concentration Modulate Mammalian Sperm Capacitation by Creating an Integrated Dialogue-A Computational Analysis*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
27. Baro Graf, C., et al., *Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation*. Mol Cell Endocrinol, 2020. **518**: p. 110992.
28. Buffone, M.G., et al., *Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(12 Pt B): p. 2610-20.
29. Arcelay, E., et al., *Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation*. Int J Dev Biol, 2008. **52**(5-6): p. 463-72.
30. Brukman, N.G., et al., *Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca(2+) entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation*. J Cell Physiol, 2019. **234**(4): p. 5276-5288.
31. Naz, R.K. and P.B. Rajesh, *Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 75.

32. Xia, J., et al., *CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation*. Biol Reprod, 2007. **77**(3): p. 551-9.
33. Ramal-Sanchez, M., et al., *Progesterone induces sperm release from oviductal epithelial cells by modifying sperm proteomics, lipidomics and membrane fluidity*. Mol Cell Endocrinol, 2020. **504**: p. 110723.
34. Rahban, R. and S. Nef, *CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa*. Mol Cell Endocrinol, 2020. **518**: p. 110951.
35. Li, Y.Y., et al., *Participation of the inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channel in the zona pellucida- and progesterone-induced acrosome reaction and calcium influx in human spermatozoa*. Asian J Androl, 2020. **22**(2): p. 192-199.
36. Jin, M., et al., *Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 4892-6.
37. Buffone, M.G., J.A. Foster, and G.L. Gerton, *The role of the acrosomal matrix in fertilization*. Int J Dev Biol, 2008. **52**(5-6): p. 511-22.
38. Kon, S., et al., *Acrosome reaction-inducing substance triggers two different pathways of sperm intracellular signaling in newt fertilization*. Int J Dev Biol, 2019. **63**(11-12): p. 589-595.
39. Hirohashi, N. and R. Yanagimachi, *Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization*. Biol Reprod, 2018. **99**(1): p. 127-133.
40. Yanagimachi, R., *Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization?* Biol Reprod, 2011. **85**(1): p. 4-5.
41. Torres-Fuentes, J.L., M. Rios, and R.D. Moreno, *Involvement of a P2X7 Receptor in the Acrosome Reaction Induced by ATP in Rat Spermatozoa*. J Cell Physiol, 2015. **230**(12): p. 3068-75.
42. Arienti, G., et al., *Effect of FSH and progesterone on human spermatozoa cytosolic calcium*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **120**(4-5): p. 180-3.
43. Lishko, P.V., I.L. Botchkina, and Y. Kirichok, *Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm*. Nature, 2011. **471**(7338): p. 387-91.
44. Strunker, T., et al., *The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm*. Nature, 2011. **471**(7338): p. 382-6.
45. Osman, R.A., et al., *Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **160**(2): p. 828-33.
46. Patrat, C., C. Serres, and P. Jouannet, *Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa*. Biol Reprod, 2002. **66**(6): p. 1775-80.
47. Sebkova, N., et al., *The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens*. Reproduction, 2012. **143**(3): p. 297-307.

48. Alfradique, V.A.P., et al., *Supplementation of 17beta-estradiol and progesterone in the co-culture medium of bovine oviductal epithelial cells and ovine spermatozoa reduces the sperm kinematics and capacitation*. *Reprod Biol*, 2018. **18**(4): p. 368-379.
49. Lopez-Torres, A.S. and M. Chirinos, *Modulation of Human Sperm Capacitation by Progesterone, Estradiol, and Luteinizing Hormone*. *Reprod Sci*, 2017. **24**(2): p. 193-201.
50. Fraser, L.R., et al., *Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa*. *Hum Reprod*, 2006. **21**(5): p. 1184-93.
51. Park, Y.J., et al., *Xenoestrogenic chemicals effectively alter sperm functional behavior in mice*. *Reprod Toxicol*, 2011. **32**(4): p. 418-24.
52. Mohamed el, S.A., et al., *Xenoestrogenic compounds promote capacitation and an acrosome reaction in porcine sperm*. *Theriogenology*, 2011. **75**(6): p. 1161-9.
53. Rehfeld, A., A.M. Andersson, and N.E. Skakkebaek, *Bisphenol A Diglycidyl Ether (BADGE) and Bisphenol Analogs, but Not Bisphenol A (BPA), Activate the CatSper Ca(2+) Channel in Human Sperm*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. **11**: p. 324.
54. Brenker, C., et al., *Synergistic activation of CatSper Ca²⁺ channels in human sperm by oviductal ligands and endocrine disrupting chemicals*. *Hum Reprod*, 2018. **33**(10): p. 1915-1923.
55. Ickowicz, D., M. Finkelstein, and H. Breitbart, *Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases*. *Asian J Androl*, 2012. **14**(6): p. 816-21.
56. Adoamnei, E., et al., *Urinary bisphenol A concentrations are associated with reproductive parameters in young men*. *Environ Res*, 2018. **161**: p. 122-128.
57. Bjorvang, R.D. and P. Damdimopoulou, *Persistent environmental endocrine-disrupting chemicals in ovarian follicular fluid and in vitro fertilization treatment outcome in women*. *Ups J Med Sci*, 2020. **125**(2): p. 85-94.
58. Li, N., et al., *Physiologically detectable bisphenol A impairs human sperm functions by reducing protein-tyrosine phosphorylation*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021. **221**: p. 112418.
59. Tang, Z.R., et al., *Oestrogenic Endocrine Disruptors in the Placenta and the Fetus*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(4).
60. Vitku, J., et al., *Differences in bisphenol A and estrogen levels in the plasma and seminal plasma of men with different degrees of infertility*. *Physiol Res*, 2015. **64**(Suppl 2): p. S303-11.
61. McMillan, R.B., et al., *DNA looping by protamine follows a nonuniform spatial distribution*. *Biophys J*, 2021. **120**(12): p. 2521-2531.
62. Ward, W.S. and D.S. Coffey, *DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells*. *Biol Reprod*, 1991. **44**(4): p. 569-74.

63. Lismer, A., et al., *Histone H3 lysine 4 trimethylation in sperm is transmitted to the embryo and associated with diet-induced phenotypes in the offspring*. Dev Cell, 2021. **56**(5): p. 671-686 e6.
64. Meyer, R.G., C.C. Ketchum, and M.L. Meyer-Ficca, *Heritable sperm chromatin epigenetics: a break to remember*. Biol Reprod, 2017. **97**(6): p. 784-797.
65. Beck, D., M. Ben Maamar, and M.K. Skinner, *Integration of sperm ncRNA-directed DNA methylation and DNA methylation-directed histone retention in epigenetic transgenerational inheritance*. Epigenetics Chromatin, 2021. **14**(1): p. 6.
66. Krawetz, S.A., *Paternal contribution: new insights and future challenges*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 633-42.
67. Martins, R.P. and S.A. Krawetz, *RNA in human sperm*. Asian J Androl, 2005. **7**(2): p. 115-20.
68. Ostermeier, G.C., et al., *Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte*. Nature, 2004. **429**(6988): p. 154.
69. Rassoulzadegan, M., et al., *Inheritance of an epigenetic change in the mouse: a new role for RNA*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 3): p. 623-5.
70. Rassoulzadegan, M., et al., *RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 469-74.
71. Fullston, T., et al., *Sperm microRNA Content Is Altered in a Mouse Model of Male Obesity, but the Same Suite of microRNAs Are Not Altered in Offspring's Sperm*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166076.
72. Gapp, K. and E.A. Miska, *tRNA fragments: novel players in intergenerational inheritance*. Cell Res, 2016. **26**(4): p. 395-6.
73. Chen, Q., et al., *Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder*. Science, 2016. **351**(6271): p. 397-400.
74. Grandjean, V., et al., *The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth*. Development, 2009. **136**(21): p. 3647-55.
75. Dickson, D.A., et al., *Reduced levels of miRNAs 449 and 34 in sperm of mice and men exposed to early life stress*. Transl Psychiatry, 2018. **8**(1): p. 101.
76. Gapp, K., et al., *Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice*. Nat Neurosci, 2014. **17**(5): p. 667-9.
77. Sellem, E., et al., *A comprehensive overview of bull sperm-borne small non-coding RNAs and their diversity across breeds*. Epigenetics Chromatin, 2020. **13**(1): p. 19.
78. de Castro Barbosa, T., et al., *High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring*. Mol Metab, 2016. **5**(3): p. 184-197.
79. Wang, C., et al., *The classic EDCs, phthalate esters and organochlorines, in relation to abnormal sperm quality: a systematic review with meta-analysis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19982.

80. Duty, S.M., et al., *Phthalate exposure and human semen parameters*. Epidemiology, 2003. **14**(3): p. 269-77.
81. Wu, H., et al., *Preconception urinary phthalate concentrations and sperm DNA methylation profiles among men undergoing IVF treatment: a cross-sectional study*. Hum Reprod, 2017. **32**(11): p. 2159-2169.
82. Van Cauwenbergh, O., et al., *Transgenerational epigenetic effects from male exposure to endocrine-disrupting compounds: a systematic review on research in mammals*. Clin Epigenetics, 2020. **12**(1): p. 65.
83. Berthrong, M., W.E. Goodwin, and W.W. Scott, *Estrogen production by the testis*. J Clin Endocrinol Metab, 1949. **9**(7): p. 579-92.
84. Burrows, H., *Carcinoma mammae occurring in a male mouse under continued treatment with oestrin*. Am J Cancer, 1935. **24**(3): p. 613-6.
85. Dunn, T.B. and A.W. Green, *Cysts of the Epididymis, Cancer of the Cervix, Granular Cell Myoblastoma, and Other Lesions after Estrogen Injection in Newborn Mice*. J Natl Cancer Inst, 1963. **31**: p. 425-55.
86. Setchell, B.P. and J.E. Cox, *Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood*. J Reprod Fertil Suppl, 1982. **32**: p. 123-7.
87. Waites, G.M. and N. Einer-Jensen, *Collection and analysis of rete testis fluid from macaque monkeys*. J Reprod Fertil, 1974. **41**(2): p. 505-8.
88. Danzo, B.J., et al., *Estradiol binding in cytosol from epididymides of immature rabbits*. Mol Cell Endocrinol, 1975. **2**(2): p. 91-105.
89. Mulder, E., et al., *Testicular estradiol receptors in the rat*. Curr Top Mol Endocrinol, 1974. **1**: p. 343-55.
90. Jensen, E.V., et al., *A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **59**(2): p. 632-8.
91. Jacobson, H.I., et al., *Determination of tritium in biological material*. Arch Biochem Biophys, 1960. **86**: p. 89-93.
92. Cooke, P.S., et al., *Estrogen receptor expression in developing epididymis, efferent ductules, and other male reproductive organs*. Endocrinology, 1991. **128**(6): p. 2874-9.
93. Schleicher, G., et al., *Differential distribution of dihydrotestosterone and estradiol binding sites in the epididymis of the mouse. An autoradiographic study*. Histochemistry, 1984. **81**(2): p. 139-47.
94. Stumpf, W.E., R. Narbaitz, and M. Sar, *Estrogen receptors in the fetal mouse*. J Steroid Biochem, 1980. **12**: p. 55-64.
95. Narbaitz, R., W.E. Stumpf, and M. Sar, *Estrogen target cells in the larynx: autoradiographic studies with 3H-diethylstilbestrol in fetal mice*. Horm Res, 1980. **12**(2): p. 113-7.

96. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 358-417.
97. Eddy, E.M., et al., *Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility.* Endocrinology, 1996. **137**(11): p. 4796-805.
98. Park, C.J., et al., *Generation and characterization of an estrogen receptor alpha-iCre knock-in mouse.* Genesis, 2017. **55**(12).
99. *Diethylstilbestrol (DES): also harms the third generation.* Prescrire Int, 2016. **25**(177): p. 294-298.
100. Haddad, R., et al., *Gestational exposure to diethylstilbestrol alters cardiac structure/function, protein expression and DNA methylation in adult male mice progeny.* Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **266**(1): p. 27-37.
101. Laronda, M.M., et al., *Diethylstilbestrol induces vaginal adenosis by disrupting SMAD/RUNX1-mediated cell fate decision in the Mullerian duct epithelium.* Dev Biol, 2013. **381**(1): p. 5-16.
102. Page, S.W., *Diethylstilboestrol--historical background and current regulatory status.* Aust Vet J, 1991. **68**(7): p. 224-5.
103. Veurink, M., M. Koster, and L.T. Berg, *The history of DES, lessons to be learned.* Pharm World Sci, 2005. **27**(3): p. 139-43.
104. Giusti, R.M., K. Iwamoto, and E.E. Hatch, *Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects.* Ann Intern Med, 1995. **122**(10): p. 778-88.
105. Veldhuis, J.D., et al., *Pathophysiology of male hypogonadism associated with endogenous hyperestrogenism. Evidence for dual defects in the gonadal axis.* N Engl J Med, 1985. **312**(21): p. 1371-5.
106. Rochira, V., et al., *Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback.* Eur J Endocrinol, 2006. **155**(4): p. 513-22.
107. Finkelstein, J.S., et al., *Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. II. Effects of estradiol administration in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men.* J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**(3): p. 621-8.
108. Winters, S.J. and P. Troen, *Evidence for a role of endogenous estrogen in the hypothalamic control of gonadotropin secretion in men.* J Clin Endocrinol Metab, 1985. **61**(5): p. 842-5.
109. Walczak-Jedrzejowska, R., et al., *Testosterone and oestradiol in concert protect seminiferous tubule maturation against inhibition by GnRH-antagonist.* Int J Androl, 2011. **34**(5 Pt 2): p. e378-85.

110. Walczak-Jedrzejska, R., et al., *Maturation, proliferation and apoptosis of seminal tubule cells at puberty after administration of estradiol, follicle stimulating hormone or both*. Asian J Androl, 2008. **10**(4): p. 585-92.
111. Kula, K., et al., *Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **178**(1-2): p. 89-97.
112. Zhang, Q., et al., *Assessment of seminal estradiol and testosterone levels as predictors of human spermatogenesis*. J Androl, 2010. **31**(2): p. 215-20.
113. Rosati, L., et al., *The Aromatase-Estrogen System in the Testes of Non-Mammalian Vertebrates*. Animals (Basel), 2021. **11**(6).
114. Shiraishi, K., S. Oka, and H. Matsuyama, *Testicular Testosterone and Estradiol Concentrations and Aromatase Expression in Men with Nonobstructive Azoospermia*. J Clin Endocrinol Metab, 2021. **106**(4): p. e1803-e1815.
115. Carreau, S., C. Delalande, and I. Galeraud-Denis, *Mammalian sperm quality and aromatase expression*. Microsc Res Tech, 2009. **72**(8): p. 552-7.
116. Janulis, L., et al., *Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase*. J Androl, 1998. **19**(1): p. 65-71.
117. Kwon, S., et al., *Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase*. Biol Reprod, 1995. **53**(6): p. 1259-64.
118. Nitta, H., et al., *Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase*. Endocrinology, 1993. **132**(3): p. 1396-401.
119. Aquila, S., et al., *Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(7): p. 3385-90.
120. Janulis, L., et al., *Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis*. J Androl, 1996. **17**(2): p. 111-6.
121. Said, L., A. Saad, and S. Carreau, *Differential expression of mRNA aromatase in ejaculated spermatozoa from infertile men in relation to either asthenozoospermia or teratozoospermia*. Andrologia, 2014. **46**(2): p. 136-46.
122. Tiwari, A., et al., *Expression of cytochrome P450 aromatase transcripts in buffalo (Bubalus bubalis)-ejaculated spermatozoa and its relationship with sperm motility*. Domest Anim Endocrinol, 2008. **34**(3): p. 238-49.
123. Araujo, F.C., et al., *Expression of the proto-oncogene c-fos and the immunolocalization of c-fos, phosphorylated c-fos and estrogen receptor beta in the human testis*. Histol Histopathol, 2009. **24**(12): p. 1515-22.
124. Hess, R.A., *Disruption of estrogen receptor signaling and similar pathways in the efferent ductules and initial segment of the epididymis*. Spermatogenesis, 2014. **4**(2): p. e979103.

125. Saraswat, S., et al., *Molecular expression and identification of caprine estrogen receptor gene 1 for fertility status in bucks*. *Reprod Domest Anim*, 2020. **55**(9): p. 1080-1092.
126. Joseph, A., et al., *Absence of estrogen receptor alpha leads to physiological alterations in the mouse epididymis and consequent defects in sperm function*. *Biol Reprod*, 2010. **82**(5): p. 948-57.
127. Kotula-Balak, M., et al., *Detection of aromatase, androgen, and estrogen receptors in bank vole spermatozoa*. *Theriogenology*, 2012. **78**(2): p. 385-92.
128. Nanjappa, M.K., et al., *Membrane-Localized Estrogen Receptor 1 Is Required for Normal Male Reproductive Development and Function in Mice*. *Endocrinology*, 2016. **157**(7): p. 2909-19.
129. Solakidi, S., et al., *Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece*. *Hum Reprod*, 2005. **20**(12): p. 3481-7.
130. Wang, G., et al., *[Expression of estrogen receptor alpha in the testis of infertile men with spermatogenic arrest]*. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2011. **17**(1): p. 27-31.
131. Han, Y., et al., *Comparing expression of progesterone and estrogen receptors in testicular tissue from men with obstructive and nonobstructive azoospermia*. *J Androl*, 2009. **30**(2): p. 127-33.
132. Liu, X., Z. Wang, and F. Liu, *Chronic exposure of BPA impairs male germ cell proliferation and induces lower sperm quality in male mice*. *Chemosphere*, 2021. **262**: p. 127880.
133. Barakat, R., et al., *Germline-dependent transmission of male reproductive traits induced by an endocrine disruptor, di-2-ethylhexyl phthalate, in future generations*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 5705.
134. Sidorkiewicz, I., et al., *Endocrine-disrupting chemicals-Mechanisms of action on male reproductive system*. *Toxicol Ind Health*, 2017. **33**(7): p. 601-609.
135. Li, X. and N. Rahman, *Impact of androgen/estrogen ratio: lessons learned from the aromatase over-expression mice*. *Gen Comp Endocrinol*, 2008. **159**(1): p. 1-9.
136. Atanassova, N.N., et al., *Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat*. *J Endocrinol*, 2005. **184**(1): p. 107-17.
137. Williams, K., et al., *Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man*. *Hum Reprod Update*, 2001. **7**(3): p. 236-47.
138. Tournaire, M., et al., *Adverse health effects in children of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES)*. *Therapie*, 2016. **71**(4): p. 395-404.

139. Browne, P., L. Van Der Wal, and A. Gourmelon, *OECD approaches and considerations for regulatory evaluation of endocrine disruptors*. Mol Cell Endocrinol, 2020. **504**: p. 110675.
140. Yilmaz, B., et al., *Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention*. Rev Endocr Metab Disord, 2020. **21**(1): p. 127-147.
141. Malmir, M., et al., *Effect of nonylphenol on spermatogenesis: A systematic review*. Andrologia, 2020. **52**(10): p. e13748.
142. Xu, Y., et al., *Nonylphenol exposure affects mouse oocyte quality by inducing spindle defects and mitochondria dysfunction*. Environ Pollut, 2020. **266**(Pt 1): p. 114967.
143. Pallotti, F., et al., *Mechanisms of Testicular Disruption from Exposure to Bisphenol A and Phthalates*. J Clin Med, 2020. **9**(2).
144. Meeker, J.D. and K.K. Ferguson, *Urinary phthalate metabolites are associated with decreased serum testosterone in men, women, and children from NHANES 2011-2012*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(11): p. 4346-52.
145. Iughetti, L., et al., *Clinical expression of endocrine disruptors in children*. Curr Opin Pediatr, 2020. **32**(4): p. 554-559.
146. Ciallella, H.L., et al., *Revealing Adverse Outcome Pathways from Public High-Throughput Screening Data to Evaluate New Toxicants by a Knowledge-Based Deep Neural Network Approach*. Environ Sci Technol, 2021. **55**(15): p. 10875-10887.
147. Vinken, M., et al., *Safer chemicals using less animals: kick-off of the European ONTOX project*. Toxicology, 2021. **458**: p. 152846.
148. Kiwitt-Cardenas, J., et al., *Associations between urinary concentrations of bisphenol A and sperm DNA fragmentation in young men*. Environ Res, 2021. **199**: p. 111289.
149. Bullach, A., et al., *Impact of Nonylphenols and Polyhalogenated Compounds in Follicular Fluid on the Outcome of Intracytoplasmic Sperm Injection*. Reprod Sci, 2021. **28**(8): p. 2118-2128.
150. Kim, J.H. and S.H. Kim, *Exposure to Phthalate Esters and the Risk of Endometriosis*. Dev Reprod, 2020. **24**(2): p. 71-78.
151. Basak, S., M.K. Das, and A.K. Duttaroy, *Plastics derived endocrine-disrupting compounds and their effects on early development*. Birth Defects Res, 2020. **112**(17): p. 1308-1325.
152. Lucaccioni, L., et al., *Endocrine-Disrupting Chemicals and Their Effects during Female Puberty: A Review of Current Evidence*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(6).
153. Jankowska, A., et al., *Phthalate exposure and neurodevelopmental outcomes in early school age children from Poland*. Environ Res, 2019. **179**(Pt B): p. 108829.
154. Bertin, A., et al., *Developmental instability is associated with estrogenic endocrine disruption in the Chilean native fish species, Trichomycterus areolatus*. Sci Total Environ, 2020. **714**: p. 136638.

155. Bedoya-Rios, D.F., et al., *Study of the occurrence and ecosystem danger of selected endocrine disruptors in the urban water cycle of the city of Bogota, Colombia*. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2018. **53**(4): p. 317-325.
156. Arukwe, A., et al., *Developmental alterations and endocrine-disruptive responses in farmed Nile crocodiles (Crocodylus niloticus) exposed to contaminants from the Crocodile River, South Africa*. Aquat Toxicol, 2016. **173**: p. 83-93.
157. Wielogorska, E., et al., *Endocrine disruptor activity of multiple environmental food chain contaminants*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(1): p. 211-20.
158. Brian, J.V., et al., *Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(6): p. 721-8.
159. De Falco, M. and V. Laforgia, *Combined Effects of Different Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) on Prostate Gland*. Int J Environ Res Public Health, 2021. **18**(18).
160. Lopez-Rodriguez, D., et al., *Multi- and Transgenerational Outcomes of an Exposure to a Mixture of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) on Puberty and Maternal Behavior in the Female Rat*. Environ Health Perspect, 2021. **129**(8): p. 87003.
161. Scholze, M., E. Silva, and A. Kortenkamp, *Extending the applicability of the dose addition model to the assessment of chemical mixtures of partial agonists by using a novel toxic unit extrapolation method*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88808.
162. Sprinkle, R.H. and D.C. Payne-Sturges, *Mixture toxicity, cumulative risk, and environmental justice in United States federal policy, 1980-2016 : Why, with much known, was little done?* Environ Health, 2021. **20**(1): p. 104.
163. Zhang, H., et al., *Vitellogenin induction by a mixture of steroidal estrogens in freshwater fishes and relevant risk assessment*. Environ Toxicol, 2009. **24**(5): p. 484-91.
164. Tran, T.K.A., et al., *The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs*. Environ Pollut, 2019. **248**: p. 1067-1078.
165. Fagin, D., *Toxicology: The learning curve*. Nature, 2012. **490**(7421): p. 462-5.
166. Vandenberg, L.N., *Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors*. Vitam Horm, 2014. **94**: p. 129-65.
167. Lee, Y.M., S.H. Park, and D.H. Lee, *Intensive weight loss and cognition: The dynamics of persistent organic pollutants in adipose tissue can explain the unexpected results from the Action for Health in Diabetes (Look AHEAD) study*. Alzheimers Dement, 2020. **16**(4): p. 696-703.
168. Wang, Y., H. Zhu, and K. Kannan, *A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures*. Toxics, 2019. **7**(2).
169. Lee, Y.M., et al., *Persistent organic pollutants in adipose tissue should be considered in obesity research*. Obes Rev, 2017. **18**(2): p. 129-139.

170. Fromme, H., et al., *Phthalates in German daycare centers: occurrence in air and dust and the excretion of their metabolites by children (LUPE 3)*. Environ Int, 2013. **61**: p. 64-72.
171. Hu, Y., et al., *Mixture effects of nonylphenol and di-n-butyl phthalate (monobutyl phthalate) on the tight junctions between Sertoli cells in male rats in vitro and in vivo*. Exp Toxicol Pathol, 2014. **66**(9-10): p. 445-54.
172. Hu, Y., et al., *Antagonistic effects of a mixture of low-dose nonylphenol and di-n-butyl phthalate (monobutyl phthalate) on the Sertoli cells and serum reproductive hormones in prepubertal male rats in vitro and in vivo*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e93425.
173. Hu, Y., D.M. Li, and X.D. Han, *Analysis of combined effects of nonylphenol and Monobutyl phthalate on rat Sertoli cells applying two mathematical models*. Food Chem Toxicol, 2012. **50**(3-4): p. 457-63.
174. Frery, N., et al., *Biomonitoring of occupational exposure to phthalates: A systematic review*. Int J Hyg Environ Health, 2020. **229**: p. 113548.
175. Koch, H.M., et al., *Phthalate exposure during cold plastisol application--a human biomonitoring study*. Toxicol Lett, 2012. **213**(1): p. 100-6.
176. Wittassek, M., et al., *Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach*. Mol Nutr Food Res, 2011. **55**(1): p. 7-31.
177. Raut, S., et al., *Genome-wide identification of estrogen receptor binding sites reveals novel estrogen-responsive pathways in adult male germ cells*. Biochem J, 2020. **477**(12): p. 2115-2131.
178. Oduwole, O.O., I.T. Huhtaniemi, and M. Misrahi, *The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(23).
179. Willson, C.J., *Phthalate Toxicity in Rats and Its Relation to Testicular Dysgenesis Syndrome in Humans*. Toxicol Pathol, 2021. **49**(8): p. 1416-1424.
180. Mitsui, T., *Effects of the prenatal environment on cryptorchidism: A narrative review*. Int J Urol, 2021. **28**(9): p. 882-889.
181. Canning, D.A., *Re: the risk of cryptorchidism among sons of women working in horticulture in denmark: a cohort study*. J Urol, 2013. **189**(4): p. 1531-2.
182. Hu, G.X., et al., *Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(3): p. 139-45.
183. Fenichel, P. and N. Chevalier, *Is Testicular Germ Cell Cancer Estrogen Dependent? The Role of Endocrine Disrupting Chemicals*. Endocrinology, 2019. **160**(12): p. 2981-2989.
184. Del-Mazo, J., et al., *Endocrine disruptors, gene deregulation and male germ cell tumors*. Int J Dev Biol, 2013. **57**(2-4): p. 225-39.

185. Liu, C., et al., *Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e676.
186. Alabi, O.A., et al., *Bisphenol A-induced Alterations in Different Stages of Spermatogenesis and Systemic Toxicity in Albino Mice (Mus musculus)*. J Health Pollut, 2021. **11**(29): p. 210307.
187. Karmakar, P.C., et al., *Gestational Exposure to Bisphenol A Affects Testicular Morphology, Germ Cell Associations, and Functions of Spermatogonial Stem Cells in Male Offspring*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(22).
188. Liu, S., et al., *Perinatal DEHP exposure induces sex- and tissue-specific DNA methylation changes in both juvenile and adult mice*. Environ Epigenet, 2021. **7**(1): p. dvab004.
189. Martinez-Arguelles, D.B. and V. Papadopoulos, *Prenatal phthalate exposure: epigenetic changes leading to lifelong impact on steroid formation*. Andrology, 2016. **4**(4): p. 573-84.
190. Veeramachaneni, D.N. and G.R. Klinefelter, *Phthalate-induced pathology in the foetal testis involves more than decreased testosterone production*. Reproduction, 2014. **147**(4): p. 435-42.
191. Fong, J.P., et al., *Relationship between urinary concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolites and reproductive hormones in polyvinyl chloride production workers*. Occup Environ Med, 2015. **72**(5): p. 346-53.
192. Huang, L.P., et al., *Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate relation to sperm motility, reactive oxygen species generation, and apoptosis in polyvinyl chloride workers*. Int Arch Occup Environ Health, 2014. **87**(6): p. 635-46.
193. Jeschke, J.K., et al., *The Action of Reproductive Fluids and Contained Steroids, Prostaglandins, and Zn(2+) on CatSper Ca(2+) Channels in Human Sperm*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 699554.
194. Adeoya-Osiguwa, S.A., et al., *17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function*. Hum Reprod, 2003. **18**(1): p. 100-7.
195. Wang, H.F., et al., *Bisphenol A Impairs Mature Sperm Functions by a CatSper-Related Mechanism*. Toxicol Sci, 2016. **152**(1): p. 145-54.
196. Prossnitz, E.R. and M. Barton, *The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(12): p. 715-26.
197. Prossnitz, E.R., et al., *Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 165-90.
198. Ullah, A., et al., *Prenatal BPA and its analogs BPB, BPF, and BPS exposure and reproductive axis function in the male offspring of Sprague Dawley rats*. Hum Exp Toxicol, 2019. **38**(12): p. 1344-1365.

199. Aly, H.A., O. Domenech, and Z.M. Banjar, *Effect of nonylphenol on male reproduction: analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **261**(2): p. 134-41.
200. Chitra, K.C., C. Latchoumycandane, and P.P. Mathur, *Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats*. Toxicology, 2003. **185**(1-2): p. 119-27.
201. Belleannee, C., et al., *Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34996.
202. Chan, J.C., et al., *Reproductive tract extracellular vesicles are sufficient to transmit intergenerational stress and program neurodevelopment*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1499.
203. Machtinger, R., L.C. Laurent, and A.A. Baccarelli, *Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation*. Hum Reprod Update, 2016. **22**(2): p. 182-93.
204. Mecklenburg, J.M. and B.P. Hermann, *Mechanisms Regulating Spermatogonial Differentiation*. Results Probl Cell Differ, 2016. **58**: p. 253-87.
205. Li, W., et al., *Alternative cleavage and polyadenylation in spermatogenesis connects chromatin regulation with post-transcriptional control*. BMC Biol, 2016. **14**: p. 6.
206. Tafrihi, M. and E. Hasheminasab, *MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases*. Microna, 2019. **8**(1): p. 4-27.
207. Kabekkodu, S.P., et al., *Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2018. **93**(4): p. 1955-1986.
208. Correia de Sousa, M., et al., *Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(24).
209. Aharoni, R. and D. Tobi, *Dynamical comparison between Drosha and Dicer reveals functional motion similarities and dissimilarities*. PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0226147.
210. Pong, S.K. and M. Gullerova, *Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes - Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins*. FEBS Lett, 2018. **592**(17): p. 2973-2986.
211. Song, M.S. and J.J. Rossi, *Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity*. Biochem J, 2017. **474**(10): p. 1603-1618.
212. Santhekadur, P.K. and D.P. Kumar, *RISC assembly and post-transcriptional gene regulation in Hepatocellular Carcinoma*. Genes Dis, 2020. **7**(2): p. 199-204.
213. Kobayashi, H. and Y. Tomari, *RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(1): p. 71-81.
214. Yoshioka, H., et al., *MicroRNA-124-3p Plays a Crucial Role in Cleft Palate Induced by Retinoic Acid*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 621045.
215. Yang, P., et al., *miR-128-3p inhibits apoptosis and inflammation in LPS-induced sepsis by targeting TGFBR2*. Open Med (Wars), 2021. **16**(1): p. 274-283.

216. Lu, J., et al., *MiR-520d-5p modulates chondrogenesis and chondrocyte metabolism through targeting HDAC1*. Aging (Albany NY), 2020. **12**(18): p. 18545-18560.
217. Huang, Q., et al., *The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(2): p. 202-10.
218. Zhou, Q.Z., et al., *Expressions of miR-525-3p and its target gene SEMG1 in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia*. Andrology, 2019. **7**(2): p. 220-227.
219. Tang, D., et al., *Altered miRNA profile in testis of post-cryptorchidopexy patients with non-obstructive azoospermia*. Reprod Biol Endocrinol, 2018. **16**(1): p. 78.
220. Walker, W.H., *Regulation of mammalian spermatogenesis by miRNAs*. Semin Cell Dev Biol, 2022. **121**: p. 24-31.
221. Yao, C., et al., *Distinct Expression Profiles and Novel Targets of MicroRNAs in Human Spermatogonia, Pachytene Spermatocytes, and Round Spermatids between OA Patients and NOA Patients*. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. **9**: p. 182-194.
222. Chen, X., et al., *Profiling of miRNAs in porcine germ cells during spermatogenesis*. Reproduction, 2017. **154**(6): p. 789-798.
223. Kim, G.J., et al., *Dicer is required for Sertoli cell function and survival*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(5): p. 867-75.
224. Korhonen, H.M., et al., *Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24821.
225. Wu, Q., et al., *The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis*. J Biol Chem, 2012. **287**(30): p. 25173-90.
226. Barbu, M.G., et al., *The Roles of MicroRNAs in Male Infertility*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(6).
227. Gupta, A., et al., *Declining levels of miR-382-3p at puberty trigger the onset of spermatogenesis*. Mol Ther Nucleic Acids, 2021. **26**: p. 192-207.
228. Pantos, K., et al., *Investigating the Role of the microRNA-34/449 Family in Male Infertility: A Critical Analysis and Review of the Literature*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 709943.
229. Dacheux, J.L. and F. Dacheux, *New insights into epididymal function in relation to sperm maturation*. Reproduction, 2014. **147**(2): p. R27-42.
230. Zhou, W., et al., *Mechanisms of tethering and cargo transfer during epididymosome-sperm interactions*. BMC Biol, 2019. **17**(1): p. 35.
231. Gervasi, M.G. and P.E. Visconti, *Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation*. Andrology, 2017. **5**(2): p. 204-218.
232. Labas, V., et al., *Analysis of epididymal sperm maturation by MALDI profiling and top-down mass spectrometry*. J Proteomics, 2015. **113**: p. 226-43.
233. Saez, F., A. Ouvrier, and J.R. Drevet, *Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability*. Asian J Androl, 2011. **13**(1): p. 11-7.

234. Frenette, G., et al., *Characterization of two distinct populations of epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine cauda epididymis*. Biol Reprod, 2010. **83**(3): p. 473-80.
235. Sullivan, R., G. Frenette, and J. Girouard, *Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit*. Asian J Androl, 2007. **9**(4): p. 483-91.
236. Frenette, G., J. Girouard, and R. Sullivan, *Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis*. Biol Reprod, 2006. **75**(6): p. 885-90.
237. Sharma, U., et al., *Small RNAs Are Trafficked from the Epididymis to Developing Mammalian Sperm*. Dev Cell, 2018. **46**(4): p. 481-494 e6.
238. Belleannee, C., et al., *Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis*. Biol Reprod, 2013. **89**(2): p. 30.
239. Browne, J.A., et al., *Region-specific microRNA signatures in the human epididymis*. Asian J Androl, 2018. **20**(6): p. 539-544.
240. Nixon, B., et al., *Next Generation Sequencing Analysis Reveals Segmental Patterns of microRNA Expression in Mouse Epididymal Epithelial Cells*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0135605.
241. Hess, R.A., R.M. Sharpe, and B.T. Hinton, *Estrogens and development of the rete testis, efferent ductules, epididymis and vas deferens*. Differentiation, 2021. **118**: p. 41-71.
242. Hess, R.A., et al., *Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis*. J Androl, 2011. **32**(6): p. 600-13.
243. Pilutin, A., et al., *Morphological and morphometric changes and epithelial apoptosis are induced in the rat epididymis by long-term letrozole treatment*. Eur J Histochem, 2021. **65**(3).
244. Fibbi, B., et al., *Estrogens regulate humans and rabbit epididymal contractility through the RhoA/Rho-kinase pathway*. J Sex Med, 2009. **6**(8): p. 2173-86.
245. Hess, R.A., *Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract*. Rev Reprod, 2000. **5**(2): p. 84-92.
246. Guo, W.T. and Y. Wang, *Dgcr8 knockout approaches to understand microRNA functions in vitro and in vivo*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(9): p. 1697-1711.
247. Bjorkgren, I. and P. Sipila, *The role of Dicer1 in the male reproductive tract*. Asian J Androl, 2015. **17**(5): p. 737-41.
248. Romero, Y., et al., *Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25241.
249. Kumar, P., *Role of Plastics on Human Health*. Indian J Pediatr, 2018. **85**(5): p. 384-389.

250. Wetherill, Y.B., et al., *In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action*. *Reprod Toxicol*, 2007. **24**(2): p. 178-98.
251. Sabry, R., et al., *MicroRNAs: potential targets and agents of endocrine disruption in female reproduction*. *J Toxicol Pathol*, 2019. **32**(4): p. 213-221.
252. Cameron, B.E., P.M. Craig, and V.L. Trudeau, *Implication of microRNA deregulation in the response of vertebrates to endocrine disrupting chemicals*. *Environ Toxicol Chem*, 2016. **35**(4): p. 788-93.
253. Bunay, J., et al., *Chronic low-dose exposure to a mixture of environmental endocrine disruptors induces microRNAs/isomiRs deregulation in mouse concomitant with intratesticular estradiol reduction*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 3373.
254. Brieno-Enriquez, M.A., et al., *Exposure to endocrine disruptor induces transgenerational epigenetic deregulation of microRNAs in primordial germ cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0124296.
255. Alexandrova, E., et al., *Small Non-Coding RNA Profiling Identifies miR-181a-5p as a Mediator of Estrogen Receptor Beta-Induced Inhibition of Cholesterol Biosynthesis in Triple-Negative Breast Cancer*. *Cells*, 2020. **9**(4).
256. Nassa, G., et al., *Post-transcriptional regulation of human breast cancer cell proteome by unliganded estrogen receptor beta via microRNAs*. *Mol Cell Proteomics*, 2014. **13**(4): p. 1076-90.
257. Paris, O., et al., *Direct regulation of microRNA biogenesis and expression by estrogen receptor beta in hormone-responsive breast cancer*. *Oncogene*, 2012. **31**(38): p. 4196-206.
258. Liu, Z., et al., *Elevated p53 Activities Restrict Differentiation Potential of MicroRNA-Deficient Pluripotent Stem Cells*. *Stem Cell Reports*, 2017. **9**(5): p. 1604-1617.
259. Gurtner, A., et al., *Dysregulation of microRNA biogenesis in cancer: the impact of mutant p53 on Drosha complex activity*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016. **35**: p. 45.
260. Suzuki, H.I. and K. Miyazono, *p53 actions on microRNA expression and maturation pathway*. *Methods Mol Biol*, 2013. **962**: p. 165-81.
261. Mahemuti, L., et al., *Bisphenol A induces DSB-ATM-p53 signaling leading to cell cycle arrest, senescence, autophagy, stress response, and estrogen release in human fetal lung fibroblasts*. *Arch Toxicol*, 2018. **92**(4): p. 1453-1469.
262. Amir, S., et al., *Endocrine Disruptors Acting on Estrogen and Androgen Pathways Cause Reproductive Disorders through Multiple Mechanisms: A Review*. *Int J Environ Res Public Health*, 2021. **18**(4).
263. Yuan, J., et al., *Bisphenol A-induced apoptosis, oxidative stress and DNA damage in cultured rhesus monkey embryo renal epithelial Marc-145 cells*. *Chemosphere*, 2019. **234**: p. 682-689.
264. Tang, L., et al., *Regulation of nonylphenol-induced reproductive toxicity in mouse spermatogonia cells by miR-361-3p*. *Mol Reprod Dev*, 2017. **84**(12): p. 1257-1270.

265. Choi, J.S., et al., *miRNA regulation of cytotoxic effects in mouse Sertoli cells exposed to nonylphenol*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011. **9**: p. 126.
266. Sirotkin, A.V., et al., *Involvement of microRNA Mir15a in control of human ovarian granulosa cell proliferation, apoptosis, steroidogenesis, and response to FSH*. *Microna*, 2014. **3**(1): p. 29-36.
267. Sirotkin, A.V., et al., *Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen*. *J Cell Physiol*, 2009. **219**(2): p. 415-20.
268. Shibahara, Y., et al., *Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f, a microRNA targeting CYP19A1*. *J Pathol*, 2012. **227**(3): p. 357-66.
269. Al-Nakhle, H., et al., *Estrogen receptor {beta}1 expression is regulated by miR-92 in breast cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(11): p. 4778-84.
270. Dorostghoal, M., et al., *Sperm miR-34c-5p Transcript Content and Its Association with Sperm Parameters in Unexplained Infertile Men*. *Reprod Sci*, 2021.
271. Abu-Halima, M., et al., *MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns*. *Fertil Steril*, 2014. **101**(1): p. 78-86 e2.
272. Abu-Halima, M., et al., *Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments*. *Fertil Steril*, 2013. **99**(5): p. 1249-1255 e16.
273. Leivonen, S.K., et al., *Identification of miR-193b targets in breast cancer cells and systems biological analysis of their functional impact*. *Mol Cell Proteomics*, 2011. **10**(7): p. M110 005322.
274. Goto, N. and H. Harayama, *Calyculin A-sensitive protein phosphatases are involved in maintenance of progressive movement in mouse spermatozoa in vitro by suppression of autophosphorylation of protein kinase A*. *J Reprod Dev*, 2009. **55**(3): p. 327-34.
275. Adams, J.A., et al., *Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase*. *Biochemistry*, 1995. **34**(8): p. 2447-54.
276. Biggers, J., W. Whitten, and D. Whittingham, *The culture of mouse embryos in vitro*. *The culture of mouse embryos in vitro.*, 1971.
277. Fraser, L.R. and L.M. Drury, *The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs*. *Biology of reproduction*, 1975. **13**(5): p. 513-518.
278. Codelia, V.A., C.J. Cortes, and R.D. Moreno, *Inhibition of the vacuolar H(+)-pump with bafilomycin A1 does not induce acrosome reaction or activate proacrosin in mouse spermatozoa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **337**(4): p. 1337-44.
279. Romarowski, A., et al., *PKA-dependent phosphorylation of LIMK1 and Cofilin is essential for mouse sperm acrosomal exocytosis*. *Dev Biol*, 2015. **405**(2): p. 237-49.

280. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
281. Snedeker, S.M. and A.G. Hay, *The alkylphenols nonylphenol and octylphenol in food contact materials and household items: exposure and health risk considerations*, in *Toxicants in Food Packaging and Household Plastics*. 2014, Springer. p. 125-150.
282. Bosman, R. *Phthalates, phthalates everywhere!* in *The Specialist Forum*. 2019. New Media.
283. Jonsson, B., *Risk assessment on butylphenol, octylphenol and nonylphenol, and estimated human exposure of alkylphenols from Swedish fish*, *Ekotoxikologiska Avdelningen*. 2006.
284. Food, U. and D. Administration, *Safety Assessment of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices*. Rockville, MD: Center for Devices and Radiological Health, US Food and Drug Administration. 2001.
285. NTP-CERHR, N., *CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di-n-Hexyl Phthalate (DnHP)*. Research Triangle Park, NC, 2003.
286. Hines, C.J., et al., *Estimated daily intake of phthalates in occupationally exposed groups*. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2011. **21**(2): p. 133-41.
287. ATSDR, D., *Toxicological Profile for Di-(2-ethylhexyl) Phthalate*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Public Health Service Atlanta, Department of Health and Human Services, GA, US (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp135.pdf>. Accessed 05 Dec 2014), 2002.
288. Osimitz, T.G., W. Droege, and J.H. Driver, *Human risk assessment for nonylphenol*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 2015. **21**(7): p. 1903-1919.
289. Gad, S.C., et al., *Tolerable Levels of Nonclinical Vehicles and Formulations Used in Studies by Multiple Routes in Multiple Species With Notes on Methods to Improve Utility*. *Int J Toxicol*, 2016. **35**(2): p. 95-178.
290. Xia, B., et al., *Phthalate exposure and childhood overweight and obesity: Urinary metabolomic evidence*. *Environ Int*, 2018. **121**(Pt 1): p. 159-168.
291. Stojanoska, M.M., et al., *The influence of phthalates and bisphenol A on the obesity development and glucose metabolism disorders*. *Endocrine*, 2017. **55**(3): p. 666-681.
292. Hatch, E.E., et al., *Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies*. *Int J Androl*, 2010. **33**(2): p. 324-32.
293. Clewell, R.A., et al., *Application of a combined aggregate exposure pathway and adverse outcome pathway (AEP-AOP) approach to inform a cumulative risk assessment: A case study with phthalates*. *Toxicol In Vitro*, 2020. **66**: p. 104855.

294. Howdeshell, K.L., et al., *Dose Addition Models Based on Biologically Relevant Reductions in Fetal Testosterone Accurately Predict Postnatal Reproductive Tract Alterations by a Phthalate Mixture in Rats*. Toxicol Sci, 2015. **148**(2): p. 488-502.
295. Howdeshell, K.L., et al., *A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner*. Toxicol Sci, 2008. **105**(1): p. 153-65.
296. Kazemi, S., et al., *Histopathology and Histomorphometric Investigation of Bisphenol A and Nonylphenol on the Male Rat Reproductive System*. N Am J Med Sci, 2016. **8**(5): p. 215-21.
297. Jambor, T., et al., *The Impact of 4-Nonylphenol on the Viability and Hormone Production of Mouse Leydig Cells*. Folia Biol (Praha), 2016. **62**(1): p. 34-9.
298. Axelsson, J., et al., *Phthalate exposure and reproductive parameters in young men from the general Swedish population*. Environ Int, 2015. **85**: p. 54-60.
299. Axelsson, J., et al., *Prenatal phthalate exposure and reproductive function in young men*. Environ Res, 2015. **138**: p. 264-70.
300. Specht, I.O., et al., *Associations between serum phthalates and biomarkers of reproductive function in 589 adult men*. Environ Int, 2014. **66**: p. 146-56.
301. Fiddian-Green, R.G. and W. Silen, *Mechanisms of disposal of acid and alkali in rabbit duodenum*. Am J Physiol, 1975. **229**(6): p. 1641-8.
302. Sellinger, E.P., et al., *Perinatal phthalate exposure increases developmental apoptosis in the rat medial prefrontal cortex*. Neurotoxicology, 2021. **87**: p. 167-173.
303. Huang, Y.F., et al., *Prenatal Bisphenol a Exposure, DNA Methylation, and Low Birth Weight: A Pilot Study in Taiwan*. Int J Environ Res Public Health, 2021. **18**(11).
304. Stenz, L., et al., *Genetic resistance to DEHP-induced transgenerational endocrine disruption*. PLoS One, 2019. **14**(6): p. e0208371.
305. Park, H.J., et al., *Expression patterns of male germ cell markers in cryptorchid pig testes*. Acta Histochem, 2019. **121**(7): p. 784-790.
306. Amoako, A.A., et al., *Impact of reference gene selection for type 2 cannabinoid receptor gene expression studies in human spermatozoa*. Andrologia, 2013. **45**(4): p. 278-84.
307. Bachmanov, A.A., et al., *Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains*. Behavior genetics, 2002. **32**(6): p. 435-443.
308. Spangenberg, E., et al., *Housing breeding mice in three different IVC systems: maternal performance and pup development*. Laboratory animals, 2014. **48**(3): p. 193-206.
309. Rao, X., et al., *An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. Biostatistics, bioinformatics and biomathematics, 2013. **3**(3): p. 71.

310. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method*. *methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
311. Schmieder, R. and R. Edwards, *Quality control and preprocessing of metagenomic datasets*. *Bioinformatics*, 2011. **27**(6): p. 863-864.
312. Dobin, A., et al., *STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner*. *Bioinformatics*, 2013. **29**(1): p. 15-21.
313. Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber, *HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data*. *bioinformatics*, 2015. **31**(2): p. 166-169.
314. Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. *Bioinformatics*, 2010. **26**(1): p. 139-140.
315. Lagos-Cabr e, R. and R.D. Moreno, *Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers*. *Biological research*, 2012. **45**(1): p. 5-14.
316. Fitzgerald, A.C., et al., *Bisphenol A and related alkylphenols exert nongenomic estrogenic actions through a G protein-coupled estrogen receptor 1 (Gper)/epidermal growth factor receptor (Egfr) pathway to inhibit meiotic maturation of zebrafish oocytes*. *Biology of reproduction*, 2015. **93**(6): p. 135, 1-11.
317. Baker, M.E. and R. Lathe, *The promiscuous estrogen receptor: Evolution of physiological estrogens and response to phytochemicals and endocrine disruptors*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2018. **184**: p. 29-37.
318. Huang, P.C., et al., *Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns*. *Environ Int*, 2009. **35**(1): p. 14-20.
319. Ihde, E.S., J.M. Loh, and L. Rosen, *Association of environmental chemicals & estrogen metabolites in children*. *BMC Endocr Disord*, 2015. **15**: p. 83.
320. Lagos-Cabre, R. and R.D. Moreno, *Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers*. *Biol Res*, 2012. **45**(1): p. 5-14.
321. Latini, G., et al., *Lactational exposure to phthalates in Southern Italy*. *Environ Int*, 2009. **35**(2): p. 236-9.
322. Main, K.M., et al., *Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age*. *Environ Health Perspect*, 2006. **114**(2): p. 270-6.
323. Zarean, M., et al., *The role of exposure to phthalates in variations of anogenital distance: A systematic review and meta-analysis*. *Environ Pollut*, 2019. **247**: p. 172-179.
324. Zhang, Q., et al., *The association between prenatal exposure to phthalates and cognition and neurobehavior of children-evidence from birth cohorts*. *Neurotoxicology*, 2019. **73**: p. 199-212.

325. Aziz, D.M., L. Ahlswede, and H. Enbergs, *Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability*. Theriogenology, 2005. **64**(6): p. 1350-6.
326. Harayama, H. and K. Nakamura, *Changes of PKA and PDK1 in the principal piece of boar spermatozoa treated with a cell-permeable cAMP analog to induce flagellar hyperactivation*. Mol Reprod Dev, 2008. **75**(9): p. 1396-407.
327. Fitzgerald, A.C., et al., *Bisphenol A and Related Alkylphenols Exert Nongenomic Estrogenic Actions Through a G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (Gper)/Epidermal Growth Factor Receptor (Egfr) Pathway to Inhibit Meiotic Maturation of Zebrafish Oocytes*. Biol Reprod, 2015. **93**(6): p. 135.
328. Momeni, H.R., et al., *A novel role for involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors in sperm acrosome reaction*. Andrologia, 2021. **53**(10): p. e14203.
329. Michelangeli, F., et al., *Endocrine disrupting alkylphenols: structural requirements for their adverse effects on Ca²⁺ pumps, Ca²⁺ homeostasis & Sertoli TM4 cell viability*. Chem Biol Interact, 2008. **176**(2-3): p. 220-6.
330. Zou, Q.X., et al., *Diethylstilbestrol activates CatSper and disturbs progesterone actions in human spermatozoa*. Hum Reprod, 2017. **32**(2): p. 290-298.
331. Godfrey, A., et al., *Sex-specific endocrine-disrupting effects of three halogenated chemicals in Japanese medaka*. J Appl Toxicol, 2019. **39**(8): p. 1215-1223.
332. Desvergne, B., J.N. Feige, and C. Casals-Casas, *PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic?* Mol Cell Endocrinol, 2009. **304**(1-2): p. 43-8.
333. Frank, A.P., et al., *Determinants of body fat distribution in humans may provide insight about obesity-related health risks*. J Lipid Res, 2019. **60**(10): p. 1710-1719.
334. Hsu, P.C., et al., *Transgenerational Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate on Anogenital Distance, Sperm Functions and DNA Methylation in Rat Offspring*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(8).
335. Hamad, M.F., *Quantification of histones and protamines mRNA transcripts in sperms of infertile couples and their impact on sperm's quality and chromatin integrity*. Reprod Biol, 2019. **19**(1): p. 6-13.
336. Shi, S., Q. Shi, and Y. Sun, *The effect of sperm miR-34c on human embryonic development kinetics and clinical outcomes*. Life Sci, 2020. **256**: p. 117895.
337. Kempisty, B., et al., *Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos*. Reprod Fertil Dev, 2008. **20**(4): p. 513-8.
338. Wu, C., et al., *Sperm miRNAs- potential mediators of bull age and early embryo development*. BMC Genomics, 2020. **21**(1): p. 798.

339. Cappallo-Obermann, H., et al., *Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly*. Mol Hum Reprod, 2011. **17**(11): p. 669-78.
340. Yuan, S., et al., *Motile cilia of the male reproductive system require miR-34/miR-449 for development and function to generate luminal turbulence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(9): p. 3584-3593.
341. Jiao, D., et al., *MicroRNA-34a targets sirtuin 1 and leads to diabetes-induced testicular apoptotic cell death*. J Mol Med (Berl), 2018. **96**(9): p. 939-949.
342. Chen, S., et al., *AroER tri-screen is a biologically relevant assay for endocrine disrupting chemicals modulating the activity of aromatase and/or the estrogen receptor*. Toxicol Sci, 2014. **139**(1): p. 198-209.
343. Kopalli, S.R., et al., *Pectinase-treated Panax ginseng ameliorates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in GC-2 sperm cells and modulates testicular gene expression in aged rats*. J Ginseng Res, 2016. **40**(2): p. 185-95.