



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Mención Ciencias Fisiológicas.

**Regulación y función de microRNAs en las alteraciones del
testículo de ratón inducidas por exposición a mezclas de
ftalatos y alquifenoles.**

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención Ciencias Fisiológicas.

Por

JULIO ARDUINO BUÑAY NOBOA

Director de Tesis: **RICARDO DANIEL MORENO MAURO**

Co-Director: **JESÚS DEL MAZO MARTÍNEZ**

Agosto, 2016

DEDICATORIA

Dedicado a mi Madre y a la memoria de mi Padre, quienes me criaron con amor y sabiduría.

Dedicado a mi hijo Maximiliano, al cual espero poder transmitirle las mismas enseñanzas de mis padres.

Para ellos siempre, mi amor y mi esfuerzo.

AGRADECIMIENTO

Para que pueda culminar esta tesis doctoral y materializar un sueño, me acompañaron personas indispensables en todo este proceso, en especial mis principales maestros, Ricardo Moreno y Jesús del Mazo. A ellos solo me queda agradecerles por darme la oportunidad, por transferirme sus conocimientos, y por ayudarme a transformarme en la persona que soy ahora. Espero ser merecedor en el mundo científico, de la responsabilidad que me han entregado.

Durante este largo camino también he podido aprender de muchas personas, por ello quisiera brevemente agradecer a todos los profesores de la Pontificia Universidad Católica de Chile, la Universidad de Valparaíso, a los investigadores y personal del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid-España, y a todos los investigadores y personas de todos los ámbitos. A quienes solicite alguna vez guía o ayuda y de los cuales recibí mucho más de lo esperado.

Muchas gracias a mis compañeros de laboratorio, a todos y cada uno de los que estuvieron y están ahora, en especial a Carlos, Raúl, Paulina, Verónica, Luz María, Daniel, Richard y Miguel, con los cuales compartí años de alegrías. Muchas gracias también a mis compañeros de promoción, con los cuales me embarque en esta emocionante aventura. De todos ellos aprendí mucho, también encontré amistad, empatía y palabras de apoyo. Deseo que, el futuro les depare muchos éxitos.

De igual forma, no puedo dejar de agradecer a mi familia, en especial al apoyo incondicional de las mujeres de mi vida; mi Madre, mi amada esposa Viviana y a mis

hermanas Erika y Verónica, sin el amor y la ayuda que ellas me han brindado no habría podido seguir adelante.

Finalmente agradezco a Dios porque desde el primer día en que empecé esta etapa de mi vida me supo acompañar y aun se que guía mis pasos.

La materialización de un sueño es simplemente el inicio de otro.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE MATERIAS.....	6
INDICE DE FIGURAS.....	10
INDICE DE TABLAS.....	15
INDICE DE ABREVIATURAS.....	17
RESUMEN.....	20
ABSTRACT.....	23
INTRODUCCION.....	26
1. El testículo y su función reproductiva.....	26
1.1 Fisiología testicular.....	26
1.2 La esteroidogénesis y la función del estradiol en los testículos.....	27
1.3 La apoptosis de células germinales.....	29
2. Los Perturbadores endocrinos y su efecto reprotóxico en machos.....	32
2.1 Perturbadores endocrino, definiciones y motivos de estudio.....	32
2.2 Perturbadores endocrinos, mecanismos de acción sobre el testículo.....	33
3. MicroRNAs y su participación en la fisiología testicular.....	35
3.1 Mecanismos de Biogénesis, regulación y degradación de microRNAs.....	35
3.2 microRNAs e isomiRs, sus funciones en los testículos y como sensores de la exposición a perturbadores endocrinos.....	37
HIPOTESIS.....	38
OBJETIVO GENERAL.....	40

MATERIALES.....	43
1. Animales.....	43
2. Reactivos.....	44
3. Soluciones.....	45
4. Sistemas operativos, programas y bases de datos.....	46
5. Oligonucleótidos.....	47
6. Anticuerpos.....	49
METODOS.....	50
1. Diseño experimental.....	50
2. Histología de testículos.....	52
3. Evaluación de la fertilidad y medición de parámetros de fecundidad.....	52
4. Inmunohistoquímica.....	53
5. Inmunofluorescencia indirecta.....	54
6. Medición de hormonas esteroideas.....	55
7. Purificación de proteínas y Western Blot.....	56
7.1 Precipitación y cuantificación de proteínas para análisis de geles bidimensionales.....	57
8. Electroforesis en 2D, adquisición de imágenes e identificación de la huella peptídica.....	57
9. Extracción de RNA y reacción de amplificación mediante RT-qPCR.....	61
9.1 Cálculo de la eficiencia de los cebadores empleados.....	64
10. Análisis del <i>miRNoma</i> por secuenciación masiva de RNAs pequeños no codificantes.....	65

11. Análisis bioinformático.....	67
12. Análisis estadístico.....	68
RESULTADOS.....	70
1. Caracterización de las alteraciones en la fisiología testicular en ratones machos, expuestos de forma crónica a ftalatos y alquifenoles o sus mezclas.....	70
2. Evaluar si la exposición crónica a ftalatos y alquifenoles o su mezcla, altera la expresión de enzimas de la vía esteroidogénica.....	86
3. Determinar si mezclas de ftalatos y alquifenoles alteran moléculas implicadas en la biogénesis, procesamiento, edición, regulación y degradación de microRNAs.....	92
4. Determinar si la expresión de microRNAs se ve alterada por la exposición crónica a la mezcla de ftalatos y alquifenoles.....	95
5. Determinar si los microRNAs diferencialmente expresados, participan en la disminución de estradiol y la apoptosis de células germinales, inducida por la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles.....	109
DISCUSIÓN.....	125
1. Características de nuestro modelo.....	126
2. Daño al testículo provocado por la exposición a ftalatos y alquifenoles de forma individual o como mezcla.....	128
3. Visión general de los cambios en la expresión de miRNAs e isomiRs, inducido por la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles.....	130

4. Disminución en los niveles de estradiol y cambios en la expresión de transcritos y proteínas involucradas en la esteroidogénesis, inducido por la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles.....	133
5. Participación de los microRNAs diferencialmente expresados por la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles, en la disminución de la síntesis de estradiol.....	141
6. Participación de los microRNAs diferencialmente expresados por la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles, en el aumento de la apoptosis de células germinales.....	143
CONCLUSIONES.....	152
PERSPECTIVAS FUTURAS AL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A PERTURBADORES ENDOCRINOS Y SUS MEZCLAS SOBRE LA SALUD HUMANA.....	154
PERSPECTIVAS FUTURAS AL ESTUDIO DE LOS microRNAs Y SU PARTICIPACIÓN EN LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PERTURBADORES ENDOCRINOS Y SUS MEZCLAS.....	155
ANEXO.....	156
BIBLIOGRAFÍA.....	169

INDICE DE FIGURAS:

- Figura 1.- Sección transversal de un túbulo seminífero de mamífero (rata).
- Figura 2.- La esteroidogénesis en el testículo
- Figura 3.- Componentes moleculares involucrados en la vía extrínsecas e intrínsecas de la apoptosis de células germinales.
- Figura 4.- Biogénesis, regulación y degradación de miRNAs
- Figura 5.- Análisis de proteomica comparativa.
- Figura 6.- Grafico representativo de los perfiles de integridad de RNA medidos por bioanalizador.
- Figura 7.- Esquema de ensayos con sondas TaqMan para miRNAs
- Figura 8.- Recta de calibrado para el gen normalizador *Gadph*
- Figura 9.- Diagrama de flujo, para la búsqueda de miRNAs e isomiRs por secuenciación de RNAs pequeños no codificantes.
- Figura 10.- La administración crónica de ftalatos y alquifenoles y sus mezclas a bajas dosis, no inducen toxicidad natal.
- Figura 11.- Ratones expuestos a una mezcla de ftalatos y alquifenoles en diferentes dosis, no cambian sus niveles séricos de testosterona y estradiol.
- Figura 12.- Ratones expuestos a una mezcla de ftalatos y alquifenoles disminuyen sus niveles de estradiol en fluido intra-testicular.

- Figura 13.- Ratones expuestos a ftalatos y alquifenoles, como compuestos individuales o como mezcla alteran los niveles de testosterona y estradiol en fluido intra-testicular.
- Figura 14.- La exposición crónica a ftalatos y alquifenoles individualmente y su mezcla, inducen aumento en el peso corporal y disminución en el peso de los testículos.
- Figura 15.- La administración crónica de Mezcla de PEs, inducen reducción en el tamaño de los túbulos seminíferos en el testículo.
- Figura 16.- Ratones expuestos de forma crónica a ftalatos y alquifenoles y su mezcla, presentan alteraciones en la histología de sus testículos.
- Figura 17.- Ratones expuestos de forma crónica a ftalatos y alquifenoles y sus mezclas aumentan el porcentaje de túbulos seminíferos degenerados.
- Figura 18.- Testículos de ratones expuestos a ftalatos y alquifenoles y su mezcla, presentan alteraciones en la progresión de la espermatogénesis (estadios VI-VII y ND).
- Figura 19.- Testículos de ratones expuestos a ftalatos, alquifenoles y su mezcla, presentan alteración en la progresión de la espermatogénesis.
- Figura 20.- La administración crónica de ftalatos y alquifenoles individualmente o como mezcla, inducen apoptosis de células germinales en ratones machos adultos.
- Figura 21.- Poblaciones de ratones expuestos a la mezcla de PEs tienen comprometida su fertilidad.
- Figura 22.- Cambios en los niveles de transcritos que controlan la síntesis de estradiol, en testículos de ratones expuestos a la Mezcla de PEs.

- Figura 23.- Efecto de los ftalatos y alquifenoles por individual y como mezcla, sobre los niveles de mRNAs que participan en la vía esteroidogénica.
- Figura 24.- La disminución de los niveles de mensajero de aromatasa (*Cyp19a1*) inducida por la Mezcla de PEs comienza a reflejarse en ratones neonatos.
- Figura 25.- Ratones expuestos a Mezclas de PEs presentan una disminución de los niveles proteicos de *Cyp19a1*.
- Figura 26.- Testículos de ratones expuestos a la Mezcla de PEs, no modifican la localización celular de la enzima *Cyp19a1*.
- Figura 27.- La exposición a Mezclas de PEs modifican los niveles de mensajero de elementos implicados en la biogénesis y edición de miRNAs.
- Figura 28.- La exposición a Mezclas de PEs modifican los niveles de mensajero de elementos implicados en la estabilidad de miRNAs.
- Figura 29.- Análisis de sistemas predice miRNAs que podrían regular genes de la vía esteroidogénica.
- Figura 30.- La exposición a las Mezclas de PEs modifican los niveles de pri-pre-miRNAs implicados en la síntesis de hormonas esteroideas.
- Figura 31.- Distribución de miRNAs por cromosoma, datos normalizados por DESeq.
- Figura 32.- Perfil de expresión global de los miRNAs detectados en las genotecas Control y Mezcla de PEs, datos normalizados por DESeq.
- Figure 33: Perfil de expresión de la familia *miR-17*
- Figura 34.- La exposición a la mezcla de PEs induce cambios en la expresión de 10 miRNAs.

- Figura 35.- miRNAs diferencialmente expresados por la exposición a Mezclas de PEs, localización por cromosoma.
- Figura 36.- Validación por RT-qPCR de los cambios en los perfiles de expresión de miRNAs inducidos por la exposición a la Mezcla de PEs.
- Figura 37.- IsomiRs diferencialmente expresados en testículos de ratones expuestos a Mezclas de PEs.
- Figura 38.- Clasificación de los isomiRs diferencialmente expresados, en relación a su miRNAs canónico.
- Figura 39.- Análisis de enriquecimiento por GO, de los mRNAs que son potenciales dianas para los miRNAs diferencialmente expresados.
- Figura 40.- Los miRNAs diferencialmente expresados participan en las alteraciones de diversos procesos biológicos y funciones celulares.
- Figura 41.- Los miRNAs diferencialmente expresados están potencialmente involucrados en patologías.
- Figura 42.- Redes de interacción entre los miRNAs diferencialmente expresados, sus reguladores y transcritos dianas.
- Figura 43.- Existe una correlación negativa entre los niveles de expresión de *LxR-β* y *miRNA-18a-5p*.
- Figura 44.- La exposición a la Mezcla de PEs, induce cambios en el proteoma del testículo de ratón adulto (1).
- Figura 45.- La exposición a la mezcla de perturbadores endocrinos, induce cambios en el proteoma del testículo de ratón adulto (2).

- Figura 46.- Análisis de redes muestra la participación de la sobre-expresión de *Drosha* en la activación de proteínas o miRNAs implicados en enfermedades reproductivas.
- Figura 47.- Modelo propuesto para la participación del *miRNA-18a-5p* en la disminución de estradiol inducido por la exposición a una Mezcla de PEs.
- Figura 48.- Participación de *miR-34b-5p* en la apoptosis de células germinales, inducida por la exposición a Mezclas de PEs.
- Figura 49.- Mecanismos propuestos para la inducción de la apoptosis de células germinales por la exposición a una Mezcla de PEs, asociado a cambios en la expresión de miRNAs y mRNAs dianas.

INDICE DE TABLAS:

- Tabla 1.- Principales reactivos usados durante esta tesis doctoral.
- Tabla 2.- Principales soluciones usadas durante esta tesis doctoral.
- Tabla 3.- Principales sistemas operativos y programas usados durante esta tesis doctoral.
- Tabla 4.- Principales bases de datos y herramientas web usadas en esta tesis doctoral
- Tabla 5.- Descripción, secuencia y eficiencia (E) de las parejas de cebadores empleados en esta tesis.
- Tabla 6.- Anticuerpos primarios y secundarios empleados durante esta tesis doctoral
- Tabla 7.- Lista de ftalatos y alquifenoles, dosis y tiempo de exposición
- Tabla 8.- Sensibilidad y coeficientes de variación para las mediciones de hormonas por RIA.
- Tabla 9: Ratones machos expuestos a mezclas de PEs no presentan cambios significativos en sus parámetros de fertilidad.
- Tabla 10.- Resumen del efecto de la exposición a PEs o a su mezcla, sobre los niveles de mRNAs implicados en la síntesis de estradiol.
- Tabla 11.- Análisis global de todas las poblaciones de miRNAs (precursores, canónicos e isomiRs) detectadas. Lecturas normalizadas por DESeq.
- Tabla 12.- Análisis global de todas las poblaciones de miRNAs (precursores, miRNAs canónicos e isomiRs) diferencialmente expresados.
- Tabla 13.- 20 miRNAs mas abundantes en las librerías de secuenciación.

- Tabla 14.- Análisis de la expresión de los miRNAs de la familia *Mir-17* en las librerías de secuenciación.
- Tabla 15.- Lista completa de las poblaciones de miRNAs (precursores, canónicos e isomiRs) diferencialmente expresados.
- Tabla 16.- Cambios en el proteoma de testículos de ratones expuestos a la mezcla de PEs.
- Tabla 17.- Asociación entre proteínas o transcritos dianas y los miRNAs diferencialmente expresados en los testículos de ratones expuestos a la Mezcla de PEs.

INDICE DE ABREVIATURAS

AR:	Receptor de andrógenos
BBP:	Ftalato de bencilo y butilo
BPA:	Bisfenol A
ChIP:	Inmunoprecipitación de cromatina
Cyp11a1:	Citocromo P450 familia 11 subfamilia A miembro1
Cyp17a1:	Citocromo P450 familia 17 subfamilia A miembro1
Cyp19a1:	Citocromo P450 familia 19 subfamilia A miembro1
CV:	Coefficiente de variación.
Csp:	Cantidad suficiente para:
Ct:	Ciclo umbral
DEHP:	Ftalato de bis (2-etiLHexilo)
DBP:	Ftalato de dibutilo
DNA:	Ácido dexoxirribonucleico
dpc:	Día “post-coitum”
ER:	Receptor de estrógenos
ES:	Error estándar
GO:	Ontología génica
IDT:	Ingesta diaria tolerable
IP:	Yoduro de propidio
KDa:	KiloDalton

Kg:	kilogramo
LH:	Hormona Luteinizante
LOAEL:	Nivel de mínimo efecto adverso observable
Log:	Logaritmo
LxR- α :	Isoforma Alfa del Receptor del hígado X
LxR- β :	Isoforma Beta del Receptor del hígado X
M:	Molar
mg:	Miligramo
mRNAs:	RNA mensajero
miRNAs:	microRNA
NP:	Nonilfenol
NOA:	Azoospermia no obstructiva
NOAEL:	Nivel sin efecto adverso observable
OP:	4-tert-octilfenol
PEs:	Perturbadores endocrinos
Ppars:	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
pre-miRNAs:	microRNAs precursores
pri-miRNAs:	microRNAs primarios
p/v:	Peso/volumen
sncRNA-Seq:	Secuenciación masiva de RNA pequeños no codificantes
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido
Sp1:	Proteína específica 1
SSCS:	Síndrome de solo células de Sertoli

Star:	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
RIA:	Radio inmuno-ensayo
RNA:	Ácido ribonucleico
RISC:	Complejo de silenciamiento de RNAs
RT-qPCR:	Retrotranscripción seguida de amplificación cuantitativa por la reacción en cadena de la polimerasa
RxR:	Receptor X para ácido retinoico
v/v	Volumen/volumen
WB:	Western Blot
3 β -Hsd:	3-Beta hidroxí-esteroide, deshidrogenasa
17 β -Hsd:	17-Beta hidroxí-esteroide, deshidrogenasa

RESUMEN

Los seres humanos y la vida animal están diariamente expuesta a mezclas de compuestos conocidos como perturbadores endocrinos (PEs), entre ellos destacan los ftalatos: [bis 2-etil-hexil ftalato (DEHP), dipentil ftalato (DBP), bencil-butil ftalato (BBP)] y los alquifenoles: [4-Nonilfenol (NP) y 4-terc-Octilfenol (OP)], por formar parte de la manufactura de productos de uso cotidiano, como plásticos y utensilios de limpieza, y liberarse de sus contenedores contaminando el medioambiente. Estos compuestos pueden alterar la homeostasis del sistema endocrino principalmente a nivel reproductivo, afectando la biosíntesis de testosterona o estrógenos. Dado que la producción de ambas hormonas controla la gametogénesis y la espermatogénesis la exposición a estos compuestos desde etapas muy tempranas del desarrollo gestacional, ha sido asociado a patologías reproductivas e infertilidad en los machos adultos. Los mecanismos por los cuales ejercen su acción aun son pocos conocidos. Sin embargo, involucran cambios en la expresión de transcritos que codifican proteínas importantes para el desarrollo y mantenimiento de la función testicular.

En este aspecto toma relevancia el estudio de los microRNAs, que son RNAs pequeños no codificantes, que actúan como reguladores negativos de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Sin embargo, se desconoce la participación de los microRNAs en las alteraciones testiculares inducidas por la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles. Por ello, en esta tesis doctoral se planteó la hipótesis de *“La exposición crónica a una mezcla definida de ftalatos y alquifenoles desregula los niveles de microRNAs, implicados en el balance testosterona/estrógenos lo cual afecta la fertilidad en ratones machos”*.

Para responder esta hipótesis, diseñamos en ratones un modelo de exposición crónica a una mezcla de los ftalatos DEHP, DBP y BBP en dosis de 0,3 mg/Kg/día cada uno y los alquifenoles NP y OP en dosis de 0,05 mg/Kg/día cada uno, estas dosis son equivalentes a los niveles de exposición en humanos. Esta mezcla fue administrada en el agua de ingesta de hembras preñadas desde el día 0,5 *post-coitum* hasta la adultez de las crías machos (60/75 días). Como grupo control a unos animales se les administro en el agua de bebida, únicamente los compuestos en que se diluyeron los ftalatos y alquifenoles.

Nuestros principales hallazgos mostraron que, los testículos de ratones expuestos a la mezcla de ftalatos y alquifenoles, presentan una disminución en los niveles intratesticulares de estradiol vía cambios en los niveles de mensajero y proteínas de enzimas de la vía esteroideogénica (principalmente una disminución de aromatasa), alteraciones en la espermatogénesis y apoptosis de células germinales vía cambios en la expresión de proteínas implicadas en este proceso. Estas alteraciones fueron asociadas con un incremento en la expresión de transcritos que participan en biogénesis (*Drosha*), edición (*Adar-1S*) y estabilidad de miRNAs (*Tut-4*).

Además, en los testículos de los animales expuestos detectamos por secuenciación masiva (NGS) 2 microRNAs sobre-expresados y 8 miRNAs disminuidos, estos datos fueron validados por qPCR, Junto con ello , se detecto por NGS 36 variantes de miRNAs (isomiRs) que presentaron cambios en sus niveles de expresión, siendo algunos de estos isomiRs, variantes de los miRNA canónicos alterados. Analizando las interacciones entre microRNAs/mRNAs se encontró que, la pérdida del control pos-transcripcional de *miR-18a-5p* hacia *LxR-β* estaría implicado en la sobreexpresión de *Star*, *Cyp17a1* y en la disminución de *Cyp19a1*, lo cual se

relaciona directamente con la disminución en la síntesis de estradiol que observamos en los animales expuestos.

Del mismo modo, la sobre-expresión de *miR-34b-5p*, *miR-7686-5p* y la disminución en los niveles de los microRNAs: *miR-1291*, *miR-15b-5p*, *miR-20a-5p*, *miR-378b*, *miR-3085-3p*, *miR-1981* y *miR-382* estaría asociada a los cambios de expresión de proteínas implicadas en la apoptosis de células germinales.

De esta forma se concluyó que la exposición a una mezcla definida de ftalatos y alquifenoles altera microRNAs específicos junto con sus variantes de secuencia, los cuales podrían estar relacionados con un fenotipo alterado en los testículo de ratones, a través de su participación en la disminución de estradiol y apoptosis de células germinales vía cambios en la expresión de sus transcritos dianas que están implicados en estos procesos. Lo que podría estar relacionado a potenciales problemas reproductivos en el hombre.

ABSTRACT

Humans and wild animals are daily exposed to mixtures of endocrine disruptors compounds (EDCs), especially the phthalates: [bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dibutyl phthalate (DBP), benzyl butyl phthalate (BBP)] and the alkylphenols [4-nonylphenol (NP), 4-tert-octylphenol (OP)] are EDCs present in the manufacture of a wide range of daily-use products (including plastics and cleaners) and leak from those products into the environment.

These compounds disrupt the endocrine system homeostasis mainly on reproductive level affecting the biosynthesis of testosterone and estradiol. Since the production of both hormones controls the gametogenesis and spermatogenesis, the exposure to phthalates and alkylphenols from early stages in the gestational development are associated to reproductive pathologies and infertility in adults males. Their mechanisms of action weren't addressed. However, defined profiles of deregulation in testis, including transcriptome patterns, have been associated with exposure to a single EDC.

Therefore it becomes relevant the study of microRNAs. microRNAs are small non coding RNAs involved in the negative regulations of gene expression at post-transcriptional level. However, the role of microRNAs in testis injury induced by the exposure of a mixture of phthalates and alkylphenols is unknown. Thus, this doctoral thesis raises the hypothesis that "A chronic exposure to a defined mixture of phthalates and alkylphenols dysregulated the microRNAs expression levels, involved in the testosterone / estrogen balance, which affects the fertility in male mice".

To answer this hypothesis, a mice model was designed with a chronic exposure to a mixture of phthalates and alkylphenols. Pregnant mice were exposed, from 0.5 post-coital day, to a mixture of 0,3 mg/Kg/day of each phthalates (di-(2-ethylhexyl), dibutyl and benzyl butyl), and 0,05 mg/Kg/day of each alkylphenols (nonylphenol and octylphenol). The doses used are equivalent to human exposure level. The mixture was diluted and administered in the drinking water, until adulthood of male mouse offspring (60 and 75 days old). For the control group, the mice drank water only with the vehicle equivalent doses diluted.

Results show that mice exposed to phthalates and alkylphenols mixture present a decrease in intratesticular estradiol levels through alterations in the mRNA expression of steroidogenic pathways genes (specially a down-regulation in aromatase level), spermatogenesis disruption, and germ cells apoptosis by deregulation of the expression of proteins related to cell death. Also, the exposure to phthalates and alkylphenols mixture was associated to an increase in mRNA expression of protein coding genes involved in biogenesis (*Drosha*), editing (*Adar-1S*) and stability (*Tut-4*) of microRNAs.

Furthermore, in mice testis exposed to EDCs mixture was detected through next generation sequence (NGS) two up-regulated and eight down-regulated miRNAs, these data was validated by qPCR. Besides, was detected by NGS thirty six microRNAs variants (isomiRs) differentially expressed, some of them variants of differentially expressed canonical miRNAs. Functional analysis of the microRNAs / mRNAs interaction found that loss of post-transcriptional control of *miR-18a-5p* towards *LxR-β* might be implicated in the over-expression of *Star*, *Cyp17a1* and the down-regulation of *Cyp19a1*, and directly associated with a decrease in the estradiol biosynthesis.

In the same manner, the over-expression of *miR-34b-5p*, *miR-7686-5p* and the down-regulation of microRNAs levels for: *miR-1291*, *miR-15b-5p*, *miR-20a-5p*, *miR-378b*, *miR-3085-3p*, *miR-1981* and *miR-382* might associated to deregulations of protein expression levels implicated on germ cell apoptosis.

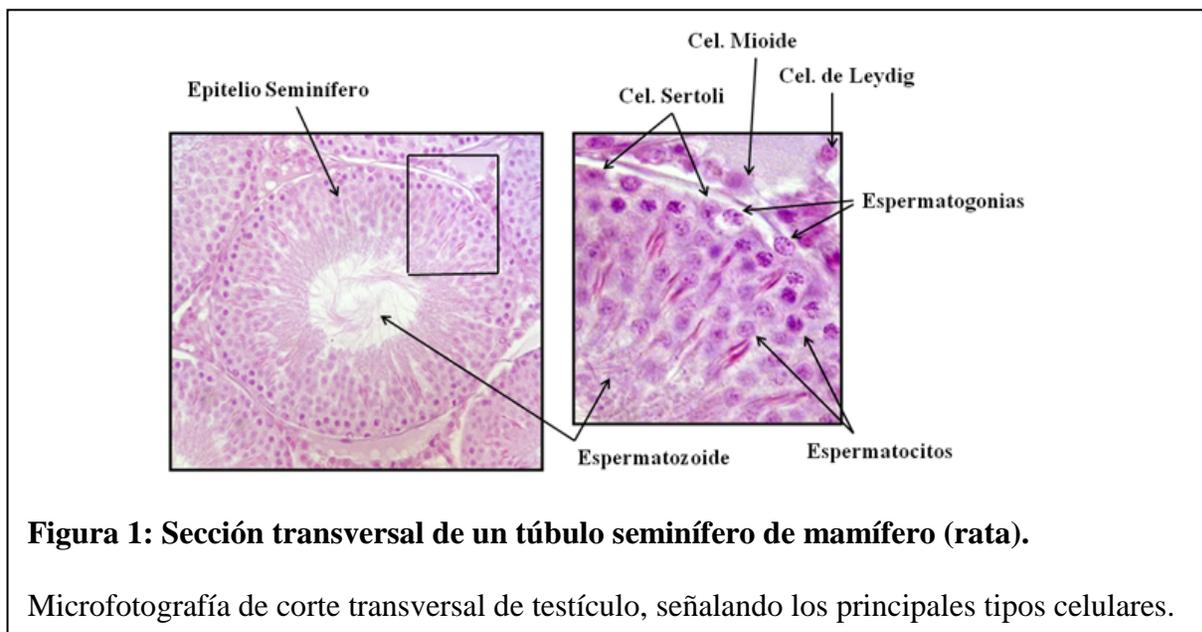
The results of this work show that an environmental exposure of a mixture of phthalates and alkylphenols induce the deregulation of the expression of specific miRNAs along to microRNAs sequence variants, which would be enough to trigger the phenotype of testis injury through a decrease in estradiol levels and germ cell apoptosis via deregulation of their mRNAs targets , which could lead to potential reproductive problems in men.

INTRODUCCIÓN

1. El testículo y su función reproductiva.

1.1 Fisiología testicular.

Los testículos en mamíferos son órganos pares y ovalados, en ellos se reconocen tres compartimentos. El compartimento intersticial formado por tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y linfáticos, en el se localizan principalmente las células de Leydig. Continúa el compartimento peritubular, formado por una membrana basal y una túnica propia de células contráctiles llamadas células mioides que conforman la estructura exterior de túbulo seminífero. El tercer compartimento lo forman el epitelio seminífero de los túbulos, que son las unidades espermatogénicas en los testículos, constituyen un epitelio estratificado y especializado donde se localizan las células de Sertoli y las células germinales (**Figura 1**).



La función principal de los testículos son dos: la síntesis de hormonas (esteroidogénesis) y el proceso de maduración, proliferación y diferenciación de las células germinales, denominado espermatogénesis, el cual tiene como objetivo dar origen a células haploides llamadas espermatozoides con capacidad de fecundar.

1.2 La Esteroidogénesis y la función del estradiol en los testículos.

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. La esteroidogénesis depende tanto de la disponibilidad de colesterol como de la captación de este por el complejo de enzimas P-450_{scc} (Miller 1995; Stocco & Manna 2005). La primera proteína que participa en este proceso es *Star* (proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda), propuesta como una proteína clave, dado que transporta colesterol desde la membrana plasmática a la membrana interna de la mitocondria (Clark & Stocco 1996; Stocco 2007), donde las enzimas esteroidogénicas (*Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Cyp17a1*, *Hsd17b3*, *Hsd11b3*) catalizan en la mitocondria y en el retículo endoplásmico, en reacciones consecutivas, la síntesis de testosterona (Payne & Hales 2004). Actualmente, es clara la función de la testosterona en el control de la espermatogénesis. Sin embargo, en las células somáticas y en las células germinales de diferentes estadios se cataliza un paso más de la esteroidogénesis, que es la conversión irreversible de testosterona y/o androstenediona a estradiol, a través de la enzima aromatasa (*Cyp19a1*) (**Figura 2**). Sin embargo, y a pesar de muchas investigaciones en reproducción, aun no está claro el papel que jugaría el estradiol en la fisiología testicular en mamíferos.

La ontogenia de la expresión de aromatasa en el ratón, revela que el transcrito y la proteína se expresan desde el día 12,5 post-coito en células de Leydig fetales y en sub-poblaciones de gonocitos de la gónada embrionaria (Borday et al. 2013). Por ello, se ha postulado que las gónadas de fetos y neonatos son sensibles a los estrógenos (Delbès et al. 2006). Por otro lado la expresión de aromatasa y por consiguiente la síntesis de estradiol, se reactiva durante la pubertad y continua en la etapa adulta (Carreau et al. 2003; Greco & Payne, 1994).

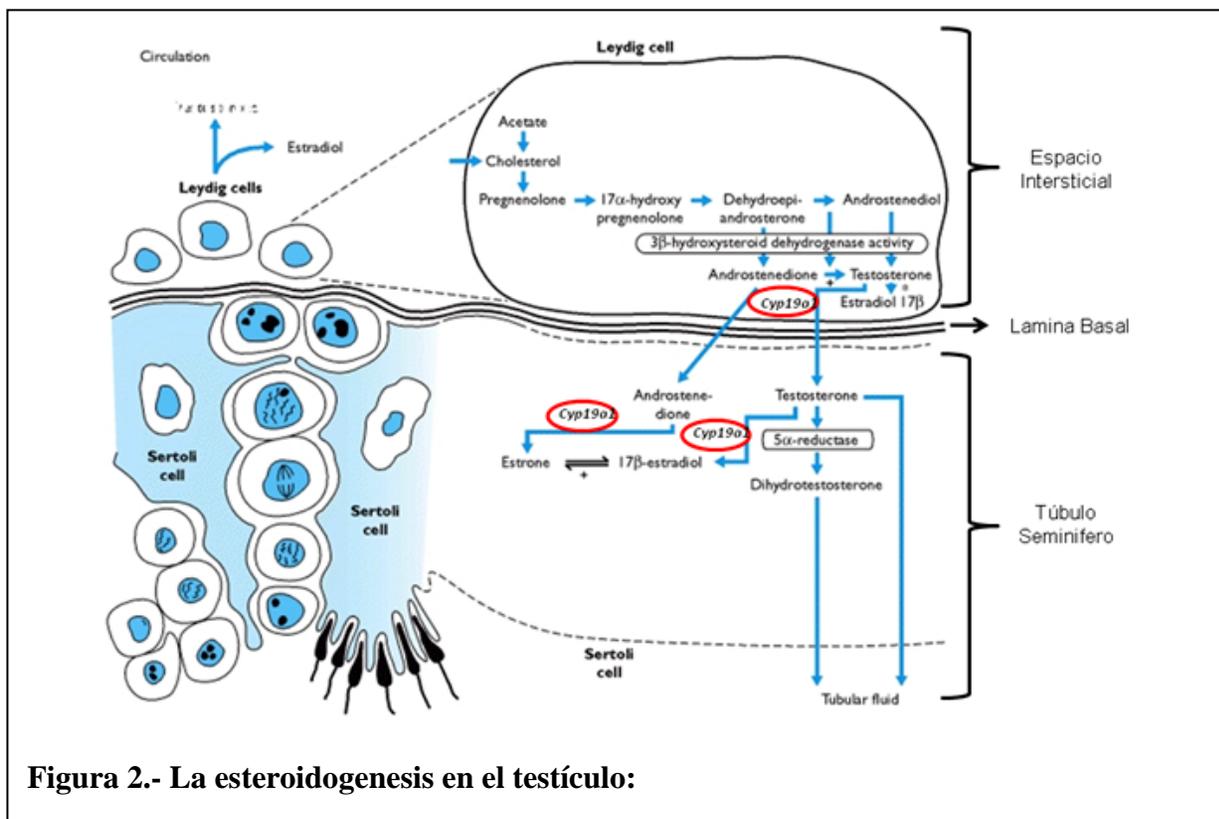


Figura 2.- La esteroidogénesis en el testículo:

Estudios en animales mutantes para aromatasa han revelado que la espermatogénesis también está bajo el control del estradiol. La sobreexpresión de aromatasa en ratones (AROM+) induce hiperplasia de células de Leydig, defectos en la espermatogénesis, apoptosis en células germinales e infertilidad (Li et al. 2006; Li et al. 2003). Mientras que, los ratones carentes de la enzima aromatasa (ArKO-/-), presentan defectos en la progresión de espermatogénesis a los

5 meses, por un bloqueo en la maduración de células germinales durante el estadio de producción de espermatidas y un incremento en la apoptosis, lo que provoca que estos animales terminen infértiles (Murata et al. 2002; Robertson et al. 1999; Fisher et al. 1998). Cabe resaltar, que en el hombre la mayor parte de fenotipos de subfertilidad e infertilidad presentan alteraciones en los niveles plasmáticos de estradiol o en la relación entre los niveles de estradiol y testosterona. Además, se han reportado casos de infertilidad por deficiencias de la enzima aromatasa (Carani et al. 2002; Morishima et al. 1995). Esto sugiere que cambios en los niveles circulantes de estradiol promovido por la desregulación en la expresión de las enzimas que lo sintetizan, en especial aromatasa, pueden alterar la espermatogénesis. Por ello, es posible pensar que agentes externos que puedan regular o desbalancear los niveles endógenos de estradiol tendrían un gran impacto en la fisiología reproductiva del macho, principalmente promoviendo la muerte de células germinales.

1.3 La apoptosis de células germinales

La muerte celular programada llamada (a-po-toe-sis) o apoptosis, fue un término acuñado por Kerr, Wyllie, y Currie en 1972 (Kerr et al. 1972) para describir un tipo específico de muerte celular, el cual podía ocurrir dentro de un contexto fisiológico en casi todos los tejidos. Una apoptosis inapropiada (disminuida o incrementada) es un factor clave en muchas patologías humanas como procesos degenerativos, daños isquémicos o cáncer (Elmore 2007). En el testículo, las células germinales están entre la supervivencia celular y la muerte mediada por apoptosis, principalmente por los siguientes motivos: 1) Es un mecanismo homeostático para mantener el número de células germinales que puedan ser alojadas por las células de Sertoli y

2) Es un mecanismo de defensa para salvaguardar la integridad del DNA luego del daño o incorrecto procesamiento, en las células que han pasado los primeros procesos de meiosis.

Los mecanismos inductores de apoptosis engloban entre otros: alteraciones en el metabolismo, alteraciones en la mitocondria, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, paradas en las fases de transición del ciclo celular, desestabilización de los componentes del citoesqueleto, daño en el DNA, o la acción de factores estresantes como toxinas, hipoxia, y estrés oxidativo.

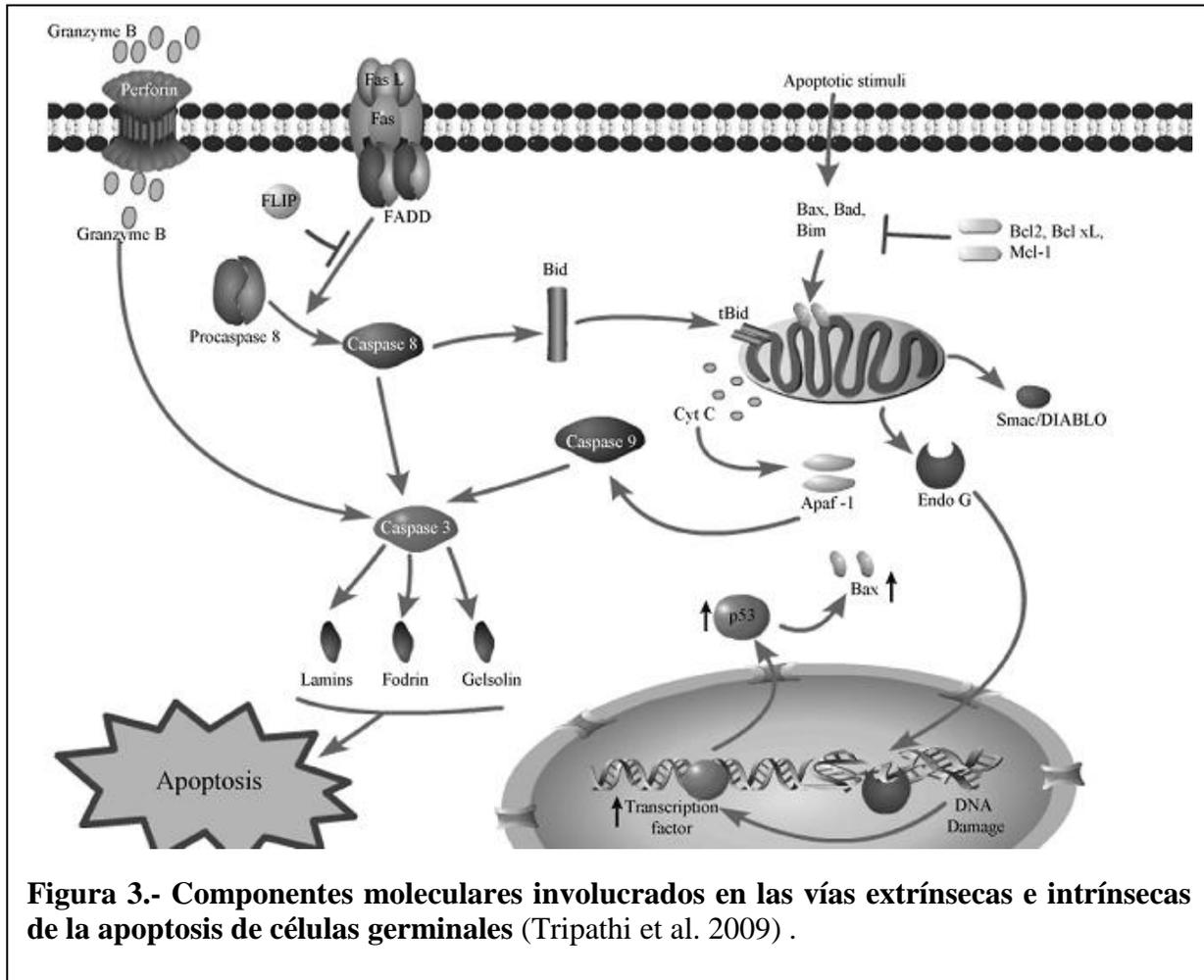
De esta forma, los mecanismos moleculares que dirigen la apoptosis se clasifican en dos vías:

1.- Las vías extrínsecas, se basan en la interacción de receptores transmembrana de las células de Sertoli con las células germinales (FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5) (Ashkenazi 1998; Chicheportiche et al. 1997; Peter & Krammer 1998; Suliman et al. 2001), que inducirán cascadas de señalización que dirigirán a las células germinales hacia los procesos de muerte celular, mediante activación de caspasas iniciadoras.

2.- La vía intrínseca mediada por señales intracelulares que producen alteraciones en la membrana mitocondrial interna, originando la apertura del poro mitocondrial y pérdida del potencial mitocondrial, culminando en dos sucesos: la liberación de factores pro-apoptóticos como Citocromo C, y la liberación de complejos proteicos tipo Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF y endonucleasas G/CAD (Du et al. 2000; Enari et al. 1998; Garrido et al. 2006; Joza et al. 2001; van Loo et al. 2002). A su vez, la regulación de los eventos de apoptosis en la mitocondria es mediado por miembros de la familia de proteínas Bcl-2 con funciones pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Cory & Adams 2002). Además, la expresión de algunas de estas proteínas, es controlada por la proteína supresora de tumores p53 (Basu & Haldar 1998).

En ambas vías de muerte celular, luego de la activación de caspasas iniciadoras continúa la activación de caspasas ejecutoras, especialmente caspasa-3; proteasa que tiene como sustratos

citoqueratinas, proteínas reparadoras del daño al DNA, componentes del citoesqueleto, proteínas nucleares y además activa endonucleasas que degradaran el DNA (**Figura 3**).



En el inicio del proceso de espermatogénesis (día 17 del ratón) se observa una apoptosis masiva de células germinales, por vías extrínsecas e intrínsecas (Moreno et al. 2006), la cual decrece pero se mantiene durante toda la vida adulta del ratón. Sin embargo, un incremento de la apoptosis de células germinales inducida por algún agente externo o xenobióticos, tiene un gran impacto en la producción de espermatozoides y puede llevar a infertilidad en mamíferos.

2. Los perturbadores endocrinos y su efecto reprotoxico en machos.

2.1 Perturbadores endocrinos, definiciones y motivos de estudio.

Los seres humanos y la población animal están expuesta de forma continua, a diferentes moléculas producidas en la manufactura de un amplio rango de productos de uso cotidiano, catalogados como contaminantes medioambientales, entre los que destacan los productos plásticos, productos de limpieza, productos de cuidado personal, etc.; (Dodson et al. 2012; Bergé et al. 2014). Siendo los contaminantes más frecuentes los ftalatos y los alquifenoles.

Los ftalatos y alquifenoles son catalogados como “*Perturbadores Endocrinos (PEs)*” definidos como “compuestos químicos exógenos que interfieren con cualquier aspecto de la acción de las hormonas” (Gore et al. 2015). Entre los cuales destacan: el ftalato de bis 2-etilhexilo (DEHP), ftalato de dipentilo (DBP), ftalato de di-isononil (DINP), ftalato de isodecilo (DIDP), ftalato de bencilo y butilo (BBP) ftalato de di-n-octil (DnOP), 4-Nonylphenol (NP) y 4-terc-Octilfenol (OP). Estos compuestos por no estar unidos covalentemente a sus contenedores, pueden liberarse y contaminar el medio ambiente (Amiridou & Voutsas 2011; Fasano et al. 2012).

Dado que estos compuestos están en todos los productos señalados en especial en los plásticos, y que depende del uso continuo de estos utensilios su liberación, el grado de exposición humana es difícil de precisar (McKinlay et al. 2008). Por ello, se ha definido que las poblaciones humanas y animales están crónicamente expuestos a bajas dosis de estos químicos, desde nuestra vida fetal hasta la adultez. Además, por su naturaleza lipofílica y su baja tasa de degradación, persisten y se acumulan en los tejidos (Gore et al. 2015). Esto se ha visto corroborado por su detección en fluidos como sangre y orina en hombres, mujeres y niños, e inclusive en muestras de: semen de adultos, leche materna, líquido amniótico y en

tejidos como placenta lo cual predice su potencial efecto en la vida fetal y la transferencia de estos compuestos por vía materna (Frederiksen et al. 2007; Braw-Tal 2010; Stefanidou et al. 2009; Dang et al. 2007; Faniband et al. 2014; Mose et al. 2007).

Existe evidencia epidemiológica que ha señalado correlaciones positivas entre la detección de estos compuestos en sangre, semen y problemas reproductivos en hombres (Kranvogel et al. 2014, Vitku et al. 2016). Lo cual se ha visto respaldado por un número considerable de modelos animales, mostrando que la exposición a estos PEs de forma individual (analizando un solo compuesto) o a ciertas mezclas de ellos inducen principalmente desbalance hormonal, reducción del peso y tamaño de los testículos, anormalidades morfológicas, incremento de la apoptosis de células germinales y oligospermia (Fisher et al. 1999; De Jager et al. 1999; Gray et al. 2000; Howdeshell et al. 2008; Gregory et al. 2009; Yoshida et al. 2001; Lagos-Cabre & Moreno 2012; Habert et al. 2014).

En resumen estos compuestos afectan el sistema reproductivo. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares por los cuales inducen alteraciones patológicas en el testículo son aun poco entendidos.

2.2 Perturbadores endocrinos, mecanismos de acción sobre el testículo

Estudios *in vivo* en el testículo e *in vitro* han sugerido que, la exposición a PEs altera principalmente la expresión de enzimas de la vía esteroidogénica tales como Star, Cyp17a1, 3 β -Hsd, 17 β -Hsd y Cyp19a1 (Naciff et al. 2005; Lehmann et al. 2004; Harris et al. 2015), modificando de esta forma la biosíntesis de testosterona (efecto antiandrogénico) y estrógenos (efecto estrogénico) (Fang et al. 2003; Soto et al. 1995; Howdeshell et al. 2008). A su vez,

pueden afectar múltiples vías de señalización, en especial aquellas dirigidas por receptores nucleares como Ppars, Ar, Er, LxR, Shp, otros (Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville 2005; Hurst & Waxman 2003; Rouiller-Fabre et al. 2015), alterando de esta forma la gametogénesis en el embrión y la esteroidogénesis y la espermatogénesis en los testículos de mamíferos adultos.

Del mismo modo, se ha mostrado que los PEs inducen cambios globales a nivel del transcriptoma (López-Casas et al. 2012). Con la finalidad de explicar estos cambios, así como sus potenciales efectos transgeneracionales, se ha señalado que la exposición individual a PEs inducen modificaciones de tipo epigenéticas que incluyen: metilaciones de DNA, remodelamiento de la cromatina por modificación de histonas y regulación pos-transcripcional vía RNAs no codificantes como los microRNAs (Larriba & del Mazo 2016; Singh & Li 2012). Sin embargo, el efecto de la exposición a mezclas de PEs sobre estos mecanismos de regulación epigenéticas aun no han sido corroborados.

3. MicroRNAs y su participación en la fisiología reproductiva en machos.

3.1 Mecanismos de biogénesis, regulación y degradación de microRNAs.

Los microRNAs (miRNAs) son un tipo de RNAs pequeños endógenos no codificantes, de cadena sencilla de 14 a 24 nucleótidos de longitud, muy conservados entre las especies, que tienen una importante función como reguladores negativos post-transcripcionales (He & Hannon 2004). Su mecanismo de acción se basa en el grado de complementariedad principalmente entre los primeros 6 nucleótidos del extremo 5' (de las posiciones 2 a la 7 o región semilla del miRNA) y comúnmente el 3' UTRs de sus mensajeros (mRNAs) dianas. También se ha mostrado que los miRNAs pueden unirse a los 5' UTRs, y a las franjas de lectura de sus mRNAs dianas (Hafner et al. 2010). La unión entre el miRNA con su mRNA diana tiene como consecuencia reprimir la traducción de mRNAs o desestabilizar el mRNA induciendo su degradación (Guo et al. 2010, Bartel 2009; Liu 2008; Mathonnet et al. 2007).

Al conjunto de miRNAs dentro de una célula, tejido u órgano se le denomina “*miRNoma*”. Los miRNA se transcriben a partir de secuencias genómicas de regiones intrónicas de genes diana y en menor grado de regiones intergenicas. Los miRNAs pueden generarse a partir de un precursor único o de un precursor común formando agrupaciones (“clusters”) de miRNAs, que posteriormente se escinden en miRNAs individuales, a modo “policistronico”, y que suelen operar en la regulación de mRNAs codificantes a proteínas de una misma red funcional (Baskerville & Bartel 2005; Marco et al. 2013; Ryazansky et al. 2011).

La biogénesis de los miRNAs implica lo que se conocen como la vía canónica y las vías alternativas (vías no-canónicas). En esta tesis nos referiremos principalmente a la vía canónica de síntesis de miRNAs. La cual, depende de la RNA polimerasa II para generar desde regiones del DNA, transcritos llamados miRNAs primarios (pri-miRNAs). Los pri-miRNAs son

sometidos a un procesamiento para formar miRNA precursores (pre-miRNAs). Siendo este segundo paso dependiente de la acción de un complejo proteico llamado microprocesador, donde la acción de la endoribonucleasa de tipo II (Drosha) es clave, al producir cadenas dobles de RNA de menor tamaño o pre-miRNAs (Lee et al. 2003). Luego estas serán transportadas del núcleo hacia el citoplasma por la enzima Exportin-5 (Xpo-5) (Yi et al. 2003).

Una vez en el citoplasma los pre-miRNAs son cortados por la endoribonucleasa de tipo III llamada Dicer, que elimina la zona de bucle de cadena sencilla, generando una cadena doble de RNAs de pequeño tamaño o dúplex de miRNAs (Feng et al. 2012; Park et al. 2011). Es importante señalar que un locus de miRNAs puede generar variantes en su secuencia canónica llamados isomiRs, Hasta ahora se tiene noción que los isomiRs son derivados de: un corte impreciso por Drosha y/o Dicer, mecanismos de edición de RNA, o por polimorfismos en nucleótidos individuales (SNPs) (Guo & Chen 2014; Starega-Roslan et al. 2015). Los isomiRs están involucrados en la regulación de los mismos o nuevos mRNAs dianas, comportándose como variantes fisiológicas de los miRNAs (García-López et al. 2013a; Neilsen et al. 2012). Se ha señalado que los perfiles de expresión de los isomiRs son siempre estables, y contribuyen a la regulación coordinada en muchos procesos biológicos (Llorens et al. 2013). Sin embargo, se han encontrado alterados en diversas patologías y tumores (Guo & Chen 2014; Telonis et al. 2015) y en el testículo, aún no se ha mostrado que los isomiRs tengan una función biológica, ni que tengan una expresión celular y temporal específica.

Durante la última parte del procesamiento de los miRNAs e isomiRs, solo una de las cadenas generadas por Dicer (RNA “leader”), se acopla a proteínas de la familia de las Argonautas siendo Ago2 un componente clave por su actividad endonucleasa. De esta manera el RNA “leader” forma el llamado complejo de silenciamiento de RNAs (RISC) (Choe et al. 2011).

Es conocido que los miRNAs pueden regularse a través de modificaciones en su secuencia, denominados “eventos de edición”, los cuales son dependientes de las proteínas de la familia ADAR (adenosinas deaminasas), que editan los nucleótidos de adenina de los precursores de miRNAs por nucleótidos de inosinas (García-López et al. 2013b). De esta manera, generan variantes de miRNAs, o inducen a la degradación de pre-miRNAs por la proteína Tudor SN (codificada por el gen *Snd1*), generalmente localizada en los gránulos de estrés y cuerpos P. La proteína Tudor SN reconoce estos residuos de inosinas en la hebra doble de RNA e induce su degradación (Scadden, 2005). En el testículo se ha mostrado que los miRNAs también pueden ser editados (Linsen et al. 2010). Sin embargo, los mutantes homocigotos deficientes para *Adar-1* o *Adar-2* no reportaron defectos reproductivos (Rice et al. 2012).

Entre los mecanismos de regulación y estabilidad de pre-miRNAs, tenemos la acción de la proteína Lin28b, que reconoce pre-miRNAs y los lleva hacia las proteínas Tutasas (Tut-4 y Tut-7) que mono o poli-uridilan los pre-miRNAs, lo cual conlleva a favorecer el procesamiento hacia miRNAs maduros o dirigir su degradación respectivamente (Kim et al. 2015). Los mecanismos de biogénesis de miRNAs señalados, los resumimos en la (**Figura 4**).

3.2 microRNAs e isomiRs sus funciones en los testículos, y como sensores de la exposición a perturbadores endocrinos.

Los miRNAs se expresan en el testículo e incluso algunos son exclusivos de este órgano (Barad et al. 2004; Seungil et al. 2007), mostrando evidencia de un rol funcional (Hossain et al. 2012; Ro et al. 2007). Los niveles de expresión de miRNAs en el testículo cambian durante el desarrollo, pubertad adultez y durante los ciclos de la espermatogénesis (Cutting et al. 2012; Buchold et al. 2010; Ro et al. 2007). Además, recientes investigaciones han señalado

que los miRNAs: miR-29, miR-142, miR-125, mir-451, miR-455, miR-335 estarían participando en la esteroidogénesis en las células de Leydig (Hu et al. 2012; Liu et al. 2014).

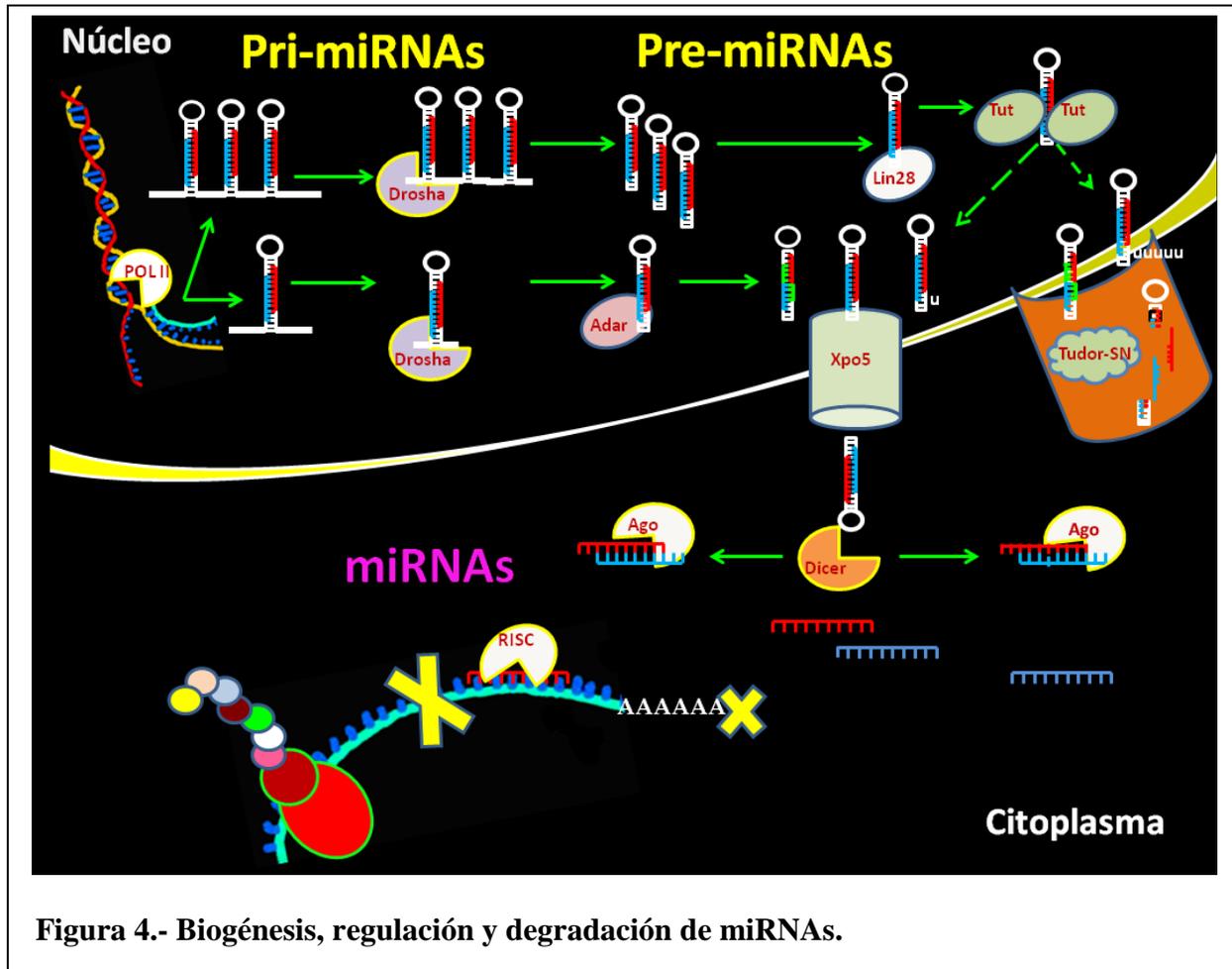


Figura 4.- Biogénesis, regulación y degradación de miRNAs.

Respecto a su participación en patologías testiculares. Los mutantes para *Drosha*^{-/-} en células germinales muestran una perturbación severa de la espermatogénesis e infertilidad, mientras que los ratones deficientes de *Dicer*^{-/-} en células somáticas (Huang & Yao 2010) y germinales (Hayashi et al. 2008) presentan una disminución en la proliferación de células germinales y deficiencias en la espermatogénesis que termina con pérdida de la fertilidad. Los mutantes para miRNAs específicos, como el miR-34a/b/c, miR-449 y miR-17-92, han mostrado inducir azoospermia u oligozoospermia en ratones (Comazzetto et al. 2014; Yuan et al. 2015; Tong et

al. 2012). Por ello, se ha planteado la hipótesis que, “*una expresión aberrante de miRNAs podría favorecer ciertas alteraciones en la espermatogénesis e infertilidad en machos*” (Smorag et al. 2012).

Por otro lado, Izzotti y colaboradores fueron los primeros en mostrar que las alteraciones en ciertos órganos inducido por la exposición a compuestos químicos carcinógenos como el humo del cigarrillo, se asociaban con cambios en la expresión de miRNAs (Izzotti et al. 2009). Esta evidencia ha sugerido que los miRNAs pueden ser indicadores sensitivos o nuevos biomarcadores de la exposición a tóxicos ambientales (Izzotti & Pulliero, 2014; Vrijens et al. 2015). En lo que respecta a la exposición a ftalatos y alquifenoles, solo existe evidencia *in vitro* señalando que, la exposición a MEHP y NP desregula la expresión de miRNAs específicos (Choi et al. 2011; Meruvu et al. 2016). Sin embargo, el efecto de una exposición crónica a mezclas de ftalatos y alquifenoles sobre el '*miRNoma*' del testículo de ratón, junto con los aspectos relacionados a sus mecanismos de biogénesis, edición, procesamiento, reciclamiento o degradación, aun no han sido investigados.

Dado todo lo anteriormente expuestos, se propone la siguiente hipótesis.

HIPOTESIS

“La exposición crónica in vivo a una mezcla definida de ftalatos y alquifenoles desregulan en ratón la expresión y función de microRNAs testiculares implicados en el balance testosterona/estrógenos y en la inducción de apoptosis, lo cual afecta la fertilidad masculina”.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la administración crónica de una mezcla definida de ftalatos y alquifenoles, induce en células de testículo de ratón cambios en la expresión de microRNAs que controlan la síntesis de estradiol y la apoptosis de células germinales.

Objetivos Específicos:

1. **Caracterizar alteraciones en la fisiología e histología testicular en ratones machos, expuestos de forma crónica a ftalatos y alquifenoles.**
 - 1.1 Validar si la administración crónica de ftalatos y alquifenoles o sus mezclas, a las dosis empleadas inducen un efecto perturbador endocrino, sobre los testículos de ratones.
 - 1.2 Evaluar si la exposición crónica de ftalatos y alquifenoles o su mezcla inducen alteraciones en el tamaño y en la histología de los testículos de ratones.
 - 1.3 Determinar si la administración crónica de ftalatos y alquifenoles o su mezcla altera la progresión de la espermatogénesis.

- 1.4 Determinar si la administración crónica de ftalatos y alquifenoles o su mezcla inducen apoptosis de células germinales.
 - 1.5 Determinar si la fertilidad en ratones machos disminuye, frente a la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles.
-
- 2. Evaluar si la exposición crónica a ftalatos y alquifenoles o su mezcla, alteran la expresión de enzimas de la vía esteroidogénica.**
 - 2.1 Determinar en testículos de ratones si la expresión de transcritos de genes que codifican enzimas de la vía esteroidogénica se altera por la exposición crónica a ftalatos y alquifenoles o su mezcla.
 - 2.2 Determinar en testículos de ratones si la expresión proteica de la enzima aromatasa se altera por la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles.
-
- 3. Determinar si la administración crónica de una mezcla de ftalatos y alquifenoles alteran los mecanismos de biogénesis, procesamiento, edición, regulación y degradación de microRNAs**
 - 3.1 Determinar si la administración crónica de una mezcla de ftalatos y alquifenoles alteran la expresión de mensajeros, implicados en la biosíntesis, procesamiento, edición y degradación de microRNAs.

3.2 Determinar si la administración crónica de una mezcla de ftalatos y alquifenoles pueden alterar los mecanismos de regulación y estabilidad de las formas precursoras de microRNAs.

4. Determinar si la expresión de microRNAs se ve alterada por la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles.

4.1 Identificar en el testículo de ratón si la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles modifica la expresión de microRNAs.

4.2 Identificar en el testículo de ratón si la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles modifican la expresión de variantes de microRNAs.

5. Determinar si microRNAs diferencialmente expresados participan en la apoptosis de células germinales y en la disminución de estradiol, inducidos por la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles.

5.1 Determinar *in silico*, los procesos biológicos y las funciones moleculares que se podrían afectar por lo microRNAs diferencialmente expresados.

5.2 Analizar *in silico* las interacciones entre los microRNAs diferencialmente expresados y sus mRNAs dianas.

5.3 Correlacionar la expresión de los microRNAs diferencialmente expresados, con sus mensajeros y/o proteínas dianas, que estén involucrados en los procesos de apoptosis de células germinales y/o síntesis de estradiol.

MATERIALES

1. Animales.

Todos los procedimientos relativos al uso y manejo de animales fueron llevados a cabo de acuerdo con las regulaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile (UC) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid-España. Siguiendo las guías para el cuidado y uso de animales en la agricultura y la investigación del Consejo nacional de Investigación de Chile y de la comisión Europea (EC) bajo la directiva 86/609/EEC.

Todos los protocolos experimentales desarrollados en este trabajo fueron revisados y aprobados por:

1. Fondo Nacional de Ciencia e Investigación (FONDECYT) (No 1150532).
2. Comité de Bioética/Bioseguridad de la facultad de Ciencias Biológicas No. CBB-009/2013.
3. Dirección General del Medioambiente Madrid-España (Ref. PROEX 054/15).

Para todos los experimentos se utilizaron ratones C57BL/6J procedentes de los bioterios de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UC y del CSIC. Los ratones fueron hospedados bajo condiciones de control de temperatura, humedad, libres de patógenos, y en ciclos luz-noche de 12 horas, con comida y bebida *ad libitum*.

2. Reactivos

Tabla 1.- Principales reactivos usados durante esta tesis doctoral.

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
Hematoxilina	Merck 1051740500, Alemania
Eosina Y	Sigma E4382, USA
Fluoromount Aqueous Mounting Medium	Sigma F4680, USA
Entellan®	Merck 107960, USA
UltraVision detection system	Thermo-Scientific, TL-015HD, 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
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo-Scientific, 4366596, USA
TaqMan® Universal Máster Mix II, no UNG	Thermo-Scientific, 4440040, USA

3. Soluciones

Tabla 2.- Principales soluciones usadas durante esta tesis doctoral.

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 (dietil pirocarbonato)	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 Fosfatasa	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 bromofenol 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 2X geles bidimensionales	7 M Urea, 2 M thiourea, 4 % [p/v] CHAPS and 0.0003 % [w/v] azul de bromofenol, agua csp.
Solución tampón de equilibrado	50 mM Tris·HCl pH 8.8, 2 % [p/v] SDS; 6 M urea; 30 % [v/v] glycerol
Solución de Citrato de Sodio	Na ₂ H ((C ₃ H ₅ O (COO) ₃) 0,01M, pH 6, agua csp.
Solución de Bouin	Acido pícrico 75%, Formalina 25%, Acido Acético 5% en exceso, (v/v)
Solución de Acido Peryodico	0,5% acido peryodico, agua csp.
Reactivo de Schiff	Fuscina básica 1gr, HCl 1N (20 ml), Na ₂ S ₂ O ₅ 1gr, Carbón Vegetal activado 0,1gr, agua csp 200 ml.
Solución de IP	3 μM Yoduro de Propideo (IP), agua csp.

4. Sistemas operativos, programas y bases de datos:

Tabla 3.- 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, Japon
GraphPad Prims 5, USA
R/Bioconductor
Mendeley 1.14, New York, USA

Tabla 4.- Principales bases de datos y herramientas web, usadas en esta tesis doctoral.

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/
Net-primer	http://www.premierbiosoft.com/
Pubmed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
TargetScan	http://www.targetscan.org/
Uniprot	http://www.uniprot.org/
Genecards	http://www.genecards.org/

5. Oligonucleótidos:

Tabla 5.- Descripción, secuencia y eficiencia (E) de las parejas de cebadores empleados en esta tesis.

Se detalla en colores si las eficiencias de las parejas de cebadores se determinaron: Negro, durante esta tesis, rojo determinada previamente (García-López & del Mazo 2012), ND = No determinada, pero publicada (Briño-Enríquez et al. 2015). La eficiencia de los cebadores para parejas de miRNAs maduros procedentes de sondas TaqMan, se estimó en 2.

<i>Gen</i>	Forward	Reverse	E
<i>Sp1</i>	TGCCACCATGAGCGACCAAGA TCA	TGCTGCTGCTTCGAGTCTGAGA AA	1,71
<i>StAR</i>	CATCAGAGCTGAACACGGTC	CCACCCCTTGAGGTCAATAC	2,10
<i>Cyp11a1</i>	AAGTATGGCCCCATTTACAGG	TGGGGTCCACGATGTAAACT	1,87
<i>Cyp17a1</i>	CTCCAGCCTGACAGACATTCT G	TCTCCCACCGTGACAAGGAT	1,86
<i>Hsd3b1</i>	ACATGGCTCTGGGAGTTATAA GGT	TTAGTGACTGGCAAGGCTTCTG	1,84
<i>Srd5a1</i>	GCGCTAGTCTACCTGGAGGGT	GAAGAGCCCACCATCTGGAG	1,78
<i>Cyp19a1</i>	ATTGGCATGCACGAGAATGG	ATTGGCATGCACGAGAATGG	2,20
<i>LxR-β</i>	CGCTACAACCACGAGACAGA	TGTTGATGGCGATAAGCAAG	1,92
<i>Gapdh</i>	GCTGATGCTCCCATGTTTCGTG AT	GTGGTGCAAGAGGCATTGCTGA C	1,72
<i>Drosha</i>	GGACCATCACGAAGGACACTT	ATGCCAGTTCCTCTGCTACCT	1,85
<i>Dicer</i>	GGATGCGATGTGCTATCTGGA	GCACTGCTCCGTGTGCAA	1,77
<i>Xpo5</i>	GAAGTAGCCCCCTCGTCTGT	AGCAGTGCTGTGCAGACATC	1,80
<i>Ago2</i>	GCCGTCCTTCCCACTACCAC	GGTATTGACACAGAGCGTGTGC	1,92
<i>Adar 1S</i>	GGGTCTTGATCGGGGAGA	CTGCCAGAGAGAGGAAGTG	1,90
<i>Tudor-SN</i>	TCTACATCGACTACGGCAACA	GTGCTGAAGGCAGGTGGTA	1,86
<i>Lin-28b</i>	GAGTCCAGGATGATTC CAAGA	GAGTCCAGGATGATTC CAAGA	ND
<i>Tut-4</i>	CAGCAAAGAAAGCCACCAGT	AAAAGGCATTCCATCCATCA	ND
<i>Tut-7</i>	CATTAAAAAGGAATGCCACA	TTCTTTTTGTCTTCATGTA AAAAG CAC	ND
<i>H2afz</i>	ACAGCGCAGCCATCCTGGCGT A	TTCCCGATCAGCGATTTGTGGA	1,96
<i>Ppia</i>	CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG	TGTAAAGTCACCACCCTGGCAC AT	1,98
<i>pre-let7f</i>	GATTGTATAGTTGTGGGGTAG TGA	TCAGGGAAGGCAATAGATTGTA	2,02

<i>pre-let7b</i>	GGGTGAGGTAGTAGGTTGTGT G	CAGGGAAGGCAGTAGGTTGT	1,98
<i>pre-let7a</i>	GGTAGTAGGTTGTATAGTTTT AGGG	TCACCTTAGGAAAGACAGTAGA TT	1,83
<i>pre-miR27a</i>	GAGGAGCAGGGCTTAGCTG	CAGGGGGCGGAACTTAGC	1,78
<i>pre-miR15b</i>	CTGTAGCAGCACATCATGGTT	AATGATTTCGCATCTTGACTGT	1,91
<i>pre-miR17</i>	AATGTCAAAGTGCTTACAGTG C	ATGCTACAAGTGCCCTCACTG	2,08
<i>pre-mir18</i>	GCGTGCTTTTTTGTCTAAGG	GCCAGAAGGAGCACTTAGGG	1,97
<i>pre-miR325</i>	TGCTTGGTTCCTAGTAGGTGCT	GCACAGTGCTTGATTGATAGG	1,81
<i>pre-mir141</i>	CAGTGCAGTGTTGGATGGTT	CTTTACCAGACAGTGTTAGGAG C	1,94

Identificador	Procedencia	Tipo
mmu-let-7a-1-3p	TaqMan® MicroRNA Assays (002178)	Sonda
mmu-miR-1a-3p	TaqMan® MicroRNA Assays (002222)	Sonda
mmu-miR-99b-5p	TaqMan® MicroRNA Assays (000436)	Sonda
mmu-miR-17-5p	TaqMan® MicroRNA Assays (002308)	Sonda
mmu-miR-18a-5p	TaqMan® MicroRNA Assays (002422)	Sonda
mmu-miR-15b-5p	TaqMan® MicroRNA Assays (000390)	Sonda
mmu-miR-34b-5p	TaqMan® MicroRNA Assays (002617)	Sonda
U6 snRNA	TaqMan® MicroRNA Assays (001973)	Sonda

6. Anticuerpos:

Tabla 6.- Anticuerpos primarios y secundarios empleados durante esta tesis doctoral

Anticuerpos Primarios	Procedencia	Tipo/Huésped	Uso	Concentración
aromatasa	Abcam, USA	Policlonal / Conejo	WB	200 µg/ml
			IHQ	20 µg/ml
Caspasa-3 activa	Cell Signaling, USA	Policlonal / Ratón	IHQ	1 mg/ml
β-actina	Sigma, ST. Louis, MO, USA	Policlonal / Ratón	WB	0,67 µg/ml
Anticuerpos Primarios	Procedencia	Tipo/Huésped	Uso	Dilución
Alexa Flúor 488 Anti-conejo IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific, USA	Policlonal / Mono	IFI	1 en 2000
Anti-ratón-HRP	CPL Biologicals, Inc, USA	-	WB	1 en 5000
Anti-conejo-HRP	CPL Biologicals, Inc, USA	-	WB	1 en 5000

MÉTODOS

1. Diseño experimental

En esta investigación se estudió el efecto en combinación (mezcla) e individual de 5 tipos de perturbadores endocrinos: Ftalato de bis 2-etilhexilo (DEHP), Ftalato de dipentilo (DBP), Ftalato de bencilo y butilo (BBP) y los alquifenoles: 4-Nonilfenol (NP), 4-terc-Octilfenol (OP). Las dosis administradas en cada experimento se detallan en la **(Tabla 7)**.

Los compuestos individualmente o como mezcla se administraron por vía oral, disueltos en el agua de bebida. Las dosis finales de exposición fueron calculadas en base a un 0.1% de las concentraciones descritas como LOAEL para cada uno de los compuestos usados (evaluando efectos a nivel reproductivo); y considerando el volumen de agua ingerida por los animales determinado en un estudio piloto, junto con el peso corporal y los datos referidos en la literatura para este parámetro. Como grupo control se administró en el agua de ingesta, solo las soluciones en las cuales fueron diluidos los compuestos. Para los ftalatos se utilizó como control DMSO (dimetilsulfoxido) a una dosis estimada de 0,25 g/kg/día y para los alquifenoles se usó como control etanol a dosis estimada de 0,06 g/kg/día, Se especifica que la dosis NOAEL para DMSO ha sido establecidas en 2,5 g/kg/día, y para etanol 2,4 g/kg/día. Por lo que, en nuestro diseño experimental estamos muy por debajo de estos valores.

El agua de ingesta con los tratamientos o el control, fue administrada simultáneamente, primero a hembras preñadas elegidas al azar desde el día 0.5 post-coito (la preñez fue asegurada luego de la detección del tapón vaginal), lo cual fue definido como nuestro (N) biológico. Los tratamientos se mantuvieron durante todo el periodo de preñez de las ratonas,

hasta el término de la lactancia, y al destete (día post-natal 21) de las crías. Los descendientes macho fueron seleccionados y hospedados por camadas en jaulas independientes, (4 animales máximo por jaula), para continuar con la administración de los tratamientos o el control, hasta los 60 y días de edad. Cumplido este periodo, un grupo de ratones machos expuestos fueron sacrificados, para la extracción de las muestras biológicas. Otros animales fueron mantenidos bajo los tratamientos hasta el día 75 de edad, para ser sometidos a cruce con ratones hembras no expuestas a ningún tratamiento y posteriormente para la obtención de muestras.

Tabla 7.- Lista de ftalatos y alquifenoles, dosis y tiempo de exposición

Compuesto	Símbolo	Dosis	Inicio del tratamiento	Final del tratamiento
Ftalato de bis 2-etilhexilo	DEHP	0,3 mg/Kg/día	Día post-coito 0,5	Día postnatal 60 / 75
Ftalato de dipentilo	DBP	0,3 mg/Kg/día		
Ftalato de bencilo y butilo	BBP	0,3 mg/Kg/día		
4-Nonilfenol	NP	0,05 mg/Kg/día		
4-terc-Octilfenol	OP	0,05 mg/Kg/día		
(DEHP + DBP + BBP) + (NP + OP)	Mezcla 0,01X (Mezcla de PEs)	(0,3 mg/Kg/día de cada ftalato) + (0,05 mg/Kg/día de cada alquifenol)		
(DEHP + DBP + BBP) + (NP + OP)	Mezcla 0,1X	(3 mg/Kg/día de cada ftalato) + (0,5 mg/Kg/día de cada alquifenol)		
(DEHP + DBP + BBP) + (NP + OP)	Mezcla 1X	(3 mg/Kg/día de cada ftalato) + (5 mg/Kg/día de cada alquifenol)		
DMSO / Etanol	Control	0,25/0,06 g/Kg/día		

2. Histología de testículos

Al final del tratamiento, los testículos fueron extraídos y fijados en solución de Bouin por 24 horas, deshidratados por series de etanol/xilol e incluidos en parafina.

Una vez montadas las muestras en parafina, fueron seccionadas en micrótomo (Leitz, Wetzlar, Alemania) a un espesor de 0,7 μ m y montadas en placas porta-objetivos previamente xilenizadas. Los cortes de tejido fueron desparafinados y rehidratados por series de xilol/etanol, y lavados en PBS para su evaluación histológica por tinción PAS (ácido peryodico-reactivo de Schiff contrateñidos con hematoxilina) siguiendo un protocolo estándar. Las secciones fueron observadas en microscopio Olympus CX31 (Olympus, Japón), los parámetros morfológicos fueron determinados en fotos adquiridas por una cámara digital Olympus 5XC-3 (Olympus, Japón) y se desarrollaron análisis morfométricos usando el software ImageJ (Schneider et al. 2012).

3. Evaluación de la fertilidad y medición de parámetros de fecundidad.

Animales representativos de cada N por grupo, fueron seleccionados al azar y mantenidos con los tratamientos (control y mezcla de PEs) hasta el día 75 de edad para asegurarnos que sean potencialmente fértiles. Cumplido el tiempo se los colocó en jaulas individuales cohabitando con dos hembras no expuestas a ningún tratamiento, La crusa se mantuvo durante 8 días (para asegurar a los menos dos ciclos estrales completos). Se aseguró la cópula con la detección del tapón vaginal, y la preñez efectiva se aseguró por el aumento del peso corporal de las hembras. Entre los días 18 a 20 post detección del tapón vaginal, las hembras cohabitadas fueron sacrificadas para la cuantificación del número de implantaciones y reabsorciones en cada uno de los cuernos uterinos. Mientras que, cada ovario fue extraído, colocado en una solución de

Bouin y procesado para su evaluación histológica como se detalló en el apartado anterior. Secciones seriadas de cada ovario fueron teñidas con hematoxilina-eosina, y se cuantificó el número de cuerpos lúteos por ovario.

A otro grupo de hembras preñadas por animales controles o expuestas a los diferentes tratamientos se les permitió terminar la preñez. Una vez nacidos los neonatos, entre los días 1 y 3 de edad se contabilizó el número de crías nacidas, tanto vivas como muertas.

Con todos los datos se procedió al cálculo de los siguientes parámetros: Tasa gestacional, índice de fecundidad, potencial de fertilidad, número de implantaciones, número de reabsorciones, pérdida pre-implantacional, mortalidad fetal y tamaño de la camada.

4. Inmunohistoquímica

La recuperación de antígenos presentes en secciones de testículos de ratón de 0,7µm de espesor, provenientes de muestras fijadas e incluidas en parafina de los animales expuestos a los ftalatos y alquifenoles, sus mezclas o a los controles, se realizó mediante exposición de estos a vapores de citrato de sodio. Para el ensayo de inmunohistoquímica, se utilizó el sistema de detección *Ultra Visión (Thermo-Scientific)*. Las muestras fueron tratadas primero con H₂O₂ al 3% por 10 minutos. A continuación, con el objetivo de prevenir uniones inespecíficas, se aplicó por 10 minutos el bloqueador de proteínas estándar, lavando tres veces por 5 minutos con una solución PBS-Tween entre cada paso del protocolo. Luego se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C.

Transcurrido este periodo, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween. Y se aplicó el anticuerpo secundario unido a biotina, y las soluciones de streptavidina-biotina y peroxidasa

10 minutos cada una. En cada paso de incubación las secciones fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween.

Finalmente, se adicionó durante 30 segundos una solución de cromógeno-sustrato preparada en el momento, consistente en solución Tris-HCl, 0,8% H₂O₂ (DAB sustrato) y 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloride (cromógeno). Para detener la reacción del cromógeno con el sustrato, cada muestra fue lavada en agua destilada.

Las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratadas en pasos sucesivos de etanol/xilol, montadas en resina (Entellan®), observadas en microscopio Olympus CX31 (Olympus, Japón) y fotografiadas con cámara digital Olympus 5XC-3 (Olympus, Japón).

5. Inmunofluorescencia indirecta

Secciones de testículos de ratón de 0,7µm de espesor, provenientes de muestras fijadas e incluidas en parafina de los animales expuestos a la Mezcla de PEs y controles, fueron sometidas a una recuperación de antígenos mediante vapores de citrato de sodio. A continuación con el objetivo de prevenir uniones inespecíficas, se incubó por 1 hora con PBS-BSA como solución de bloqueo, transcurrido el tiempo se procedió a lavar las muestras tres veces por 5 minutos con PBS-Tween y se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS-BSA, durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C.

Transcurrido el periodo de incubación con el anticuerpo primario, las secciones se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS-Tween y se incubaron en oscuridad con una solución que contenía el anticuerpo secundario diluido en PBS-BSA, durante 2 horas. Finalizado este periodo las muestras fueron lavadas y los núcleos celulares fueron teñidos con una solución de IP, para luego ser montadas con fluoromont®.

Las secciones fueron observadas en el microscopio confocal invertido Olympus Fluoview SV-1000 (Olympus, Japón). Todos los parámetros fueron mantenidos constantes, para un particular tipo de experimento, las imágenes fueron adquiridas en 8 bits y se usaron 2 canales, con el canal No 1, se usó el anticuerpo secundario Alexa 488 a una λ de excitación 488 nm, λ de emisión 505-525 nm; y con el canal No.2 se usó IP a una λ de excitación 493 nm, y λ de emisión de 630 nm. Se garantizó que la intensidad $I=(x, y, z)$, no estuviese saturada y que el fondo de la imagen fuese superior a 1, ajustando la potencia del laser, la ganancia y el *offset* del detector. Se empleó el objetivo de 60X, y la superposición de las señales de Alexa 488 e IP se realizó con el software Olympus Fluoview 5.0.

6. Medición de hormonas esteroideas.

Ratones expuestos a los ftalatos y alquifenoles, sus mezclas o a los controles fueron anestesiados vía intraperitoneal (IP), con ketamina (80-120 mg/Kg) / xilacina (5-16 mg/kg) y por punción cardiaca se extrajo sangre, con ayuda de una jeringa de tuberculina (un volumen aproximado de 1 ml). La sangre se dejó coagular y luego, por centrifugación, se recogió una fracción de sobrenadante, que corresponde a suero sanguíneo, el cual fue congelado a -80°C hasta su utilización.

Se aisló fluido intratesticular (seminiferous tubular fluid [STF]), de acuerdo con el protocolo descrito por (Jarow et al. 2001), el cual fue luego almacenado a -80°C hasta su utilización. Se midieron los niveles de testosterona y estradiol en 50 μl de suero sanguíneo cada uno y en 5 μl de líquido intratesticular de cada testículo por animal (diluido en 300 μl de PBS). La medición se realizó por radioinmuno-ensayo (RIA) en el Departamento de Endocrinología de la UC. Todas las muestras fueron ensayadas simultáneamente y medidas en duplicado. La

sensibilidad y los coeficientes de variación (CV) de los intra e inter-ensayos fueron: para testosterona 4,93 pg/tubo, CV <13,4 y <7,6 respectivamente, y para estradiol 2,25 pg/tubo, CV <11,3 y <24,9 respectivamente (**Tabla 8**).

Tabla 8.- Sensibilidad y coeficientes de variación para las mediciones de hormonas por RIA. CV= coeficiente de variación.

Hormona medida por RIA	Intra-ensayo CV			Inter-ensayo CV			Limite de detección (pM/ml)
	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto	
Testosterona	4,65	6,80	13,41	6,22	7,47	7,64	634,00
Estradiol	6,41	6,65	11,32	8,09	15,67	24,99	408,00

7. Purificación de proteínas y Western Blot

Los testículos aislados de ratones expuestos a la Mezcla de PEs y controles, fueron decapsulados y homogenizados mediante sonicación en tampón RIPA, cóctel de inhibidor de proteasas y cóctel de inhibidores de fosfatasa. Las proteínas fueron purificadas por centrifugación a 12000 G a 4°C por 10 minutos y posteriormente fueron cuantificadas por el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). A continuación 30 µg de proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% SDS-PAGE bajo condiciones desnaturalantes y reductoras. Las proteínas se transfirieron a una membrana de Nitrocelulosa (Thermo Scientific) manteniendo la carrera electroforética a 350 mA por 2 horas. Las membranas fueron bloqueadas con una solución de bloqueo para proteínas e incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios respectivos: anti-aromatasa (0,2 mg/ml), y anti-β-actina (0.67 µg/ml) usado como control de carga. A continuación las membranas se lavaron tres veces por 5 minutos en PBS-Tween. Para luego incubarse por una

hora con sus respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). Cada Western Blot fue revelado por quimioluminiscencia.

7.1 Precipitación y cuantificación de proteínas para análisis en geles bidimensionales.

Se diseñaron grupos de tres replicas biológicas de proteínas aisladas de testículos de ratones adultos, tanto de los grupos control y como los expuestos a la Mezcla de PEs las cuales fueron purificadas como describimos anteriormente.

Los extractos proteínicos fueron precipitados usando metanol/cloroformo (Wessel & Flugge 1984) y las muestras fueron incubadas brevemente a 4°C añadiendo metanol frio y cloroformo. Luego las muestras fueron centrifugadas a 13,000 g / 4°C por 15 minutos. Se aisló la interface liquida que contiene las proteínas la cual fue lavada y centrifugada con metanol frio, obteniendo un precipitado de proteínas, el cual fue secado y re-suspendido en solución tampón 2X para geles bidimensionales. La concentración de proteínas fue cuantificada por el ensayo de proteínas RC-DC (BIO-RAD, USA).

8. Electroforesis en 2D, adquisición de imágenes e identificación de la huella peptídica.

La electroforesis bidimensional y la identificación de huella peptídica se llevaron a cabo en el Servicio de proteomica de CIB-CSIC. Para la electroforesis en 2D, alícuotas de 150 µg de proteínas fueron diluidas a un volumen de 350 µl en solución tampón 2X añadiendo 18.2 M DTT y 0.5 % de IPG solución tampón de anfilitos (pH 3-10) (Bio-Rad, USA). La primera dimensión fue corrida en tiras impregnadas con IPG (pH 3-10 NL, 17 cm, Bio-Rad, USA) en cámaras (Protean IEF cell system, Bio-Rad, USA) a 20°C. A continuación se desarrollo una

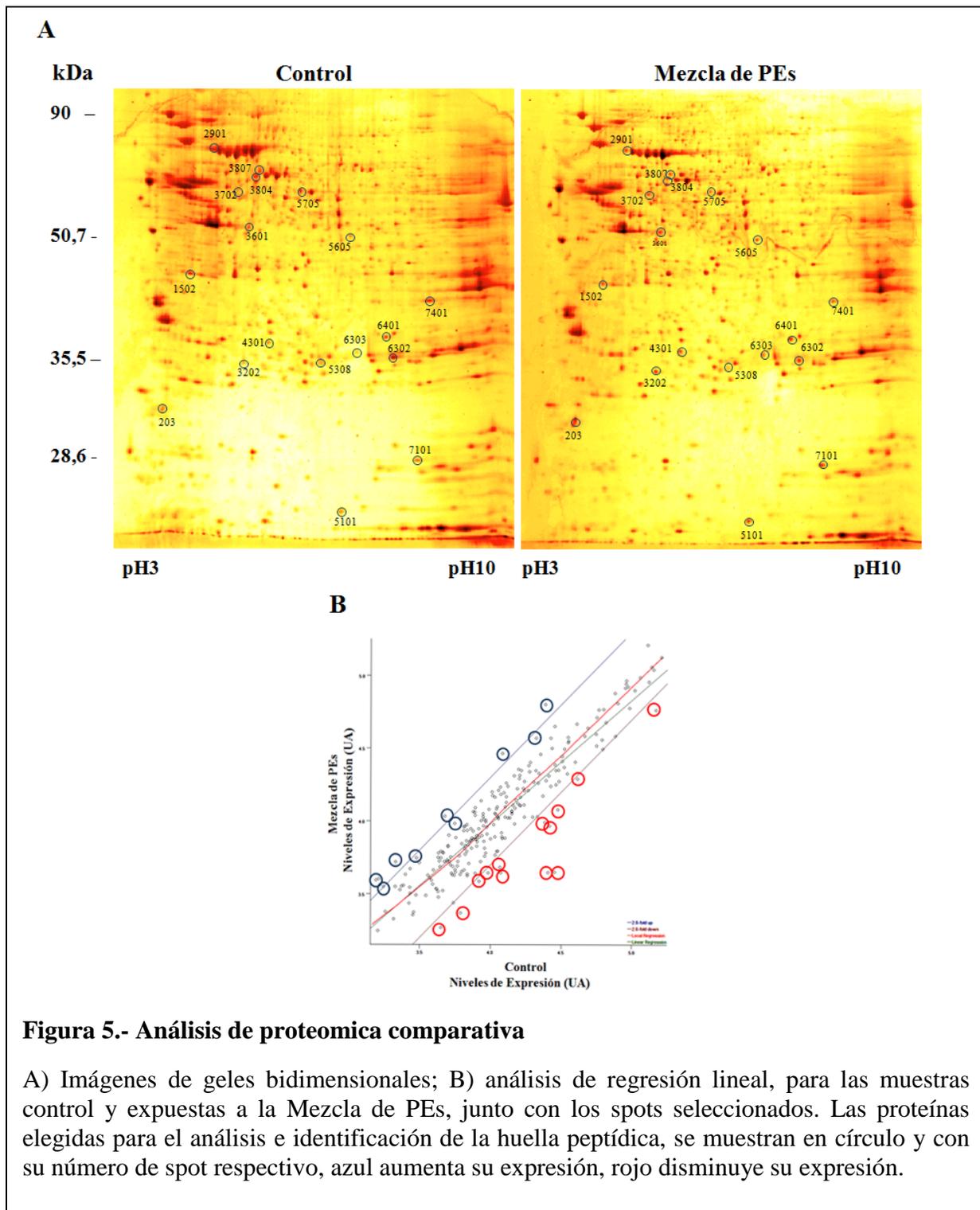
rehidratación activa a 50 V por lo menos durante 16 h. Se ajustaron los electrodos bajo los extremos de las tiras, y se corrió bajo el siguiente programa: rampa lineal 300 V durante 45 minutos, 2 rampas rápidas de 3.500 V durante 22 h 45 minutos, y 5000 V durante 30 minutos, y una rampa rápida final de 100 V, hasta que la tensión total/tiempo alcanzó 80.000 V/h. El límite de corriente máxima fue 99 μ A/tira. Cada tira de gel fue equilibrado con 5 ml de solución tampón de equilibrado añadiendo 52 mM de DTT por 15 minutos y luego en 5 ml de solución tampón de equilibrado añadiendo 130 mM de iodoacetamida por 15 minutos.

La segunda dimensión fue corrida en geles de SDS-PAGE (12% de acrilamida) de 1,5 mm de espesor, 18 x 20 cm. Los geles fueron construidos con el protocolo de manufactura estándar (BIO-RAD), preparado el día anterior, y mantenidos a 4 °C antes de su uso. Los geles de la segunda dimensión fueron corridos a 5 vatios/gel durante 30 minutos y después a 17 vatios/gel hasta que el frente de corrida llegara hasta el borde inferior, en una cámara fría Protean II-xi Cell (Bio-Rad), y añadiendo 10 μ l de marcador de proteínas (Bio-Rad). Los geles fueron teñidos con tinción SYPRO Rubí (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la adquisición de las imágenes y cortar los spots de interés se utilizó el equipo EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad). Los spots seleccionados y cortados fueron sometidos a una digestión enzimática. Para tal proceso, las piezas de gel fueron primero lavadas con 50mM de bicarbonato de amonio (Sigma) y luego incubadas con acetonitrilo (Scharlau) y tripsina (Promega) a una concentración de 12,5 ng/ μ l en 50 nM de solución de bicarbonato de amonio por 8h a 37°C. Se añadió a la extracción de péptidos 100% de acetonitrilo conteniendo 0.5% ácido trifluoroacético (Sigma). La elución de péptidos en tripsina fue secada por centrifugación y re-suspendida en 6 μ l de acetonitrilo al 30%, ácido trifluoroacético 0,1% 1 μ l. Cada mezcla de péptidos fue depositado en 800 μ M de AnchorChip (Bruker-Daltonics)

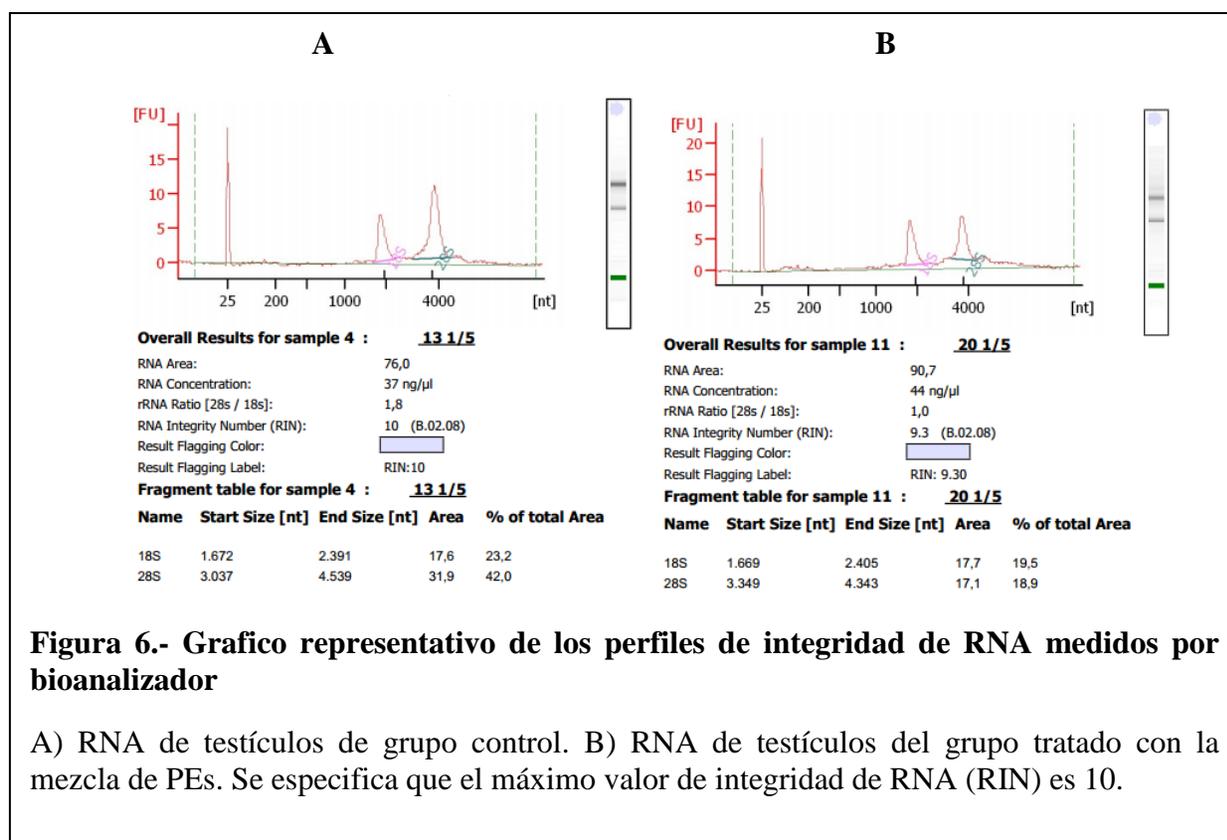
añadiendo 1 μ l de la solución de 3mg/ml de α -cyano-ácido 4hidroxicinámico en 33% de acetonitrilo-0.1% ácido trifluoroacético, dejando secar en un cuarto de temperatura.

Una vez digeridas las muestras, se analizaron en el espectrómetro de masas Autoflex III TOF-TOF (Bruker-Daltonics). La calibración del equipo fue realizada con iones fragmentados obtenidos de una mezcla de péptidos en el rango de 750 a 4000 Da, el error típico observado en la calibración estuvo debajo de 50 ppm. El resultado es un espectro con una serie de masas (m/z) que corresponden a los péptidos trípticos característicos de la o las proteínas presentes en los spots seleccionados. Esas masas y sus fragmentaciones se combinaron usando el programa BioTools 3.0 (Bruker-Daltonics) y se enfrentaron a la base de datos de proteínas no-redundantes (SwissProt) del NCBI. Empleando el motor de búsqueda MASCOT 2.3 (Matrix Science) se compararon todas las masas trípticas teóricas de las proteínas contenidas en la base de datos frente a las masas experimentales obtenidas de los spots seleccionados. Proteínas con una puntuación (score) superior a 75 fueron consideradas significativas (p-valor <0,05) **(Figura 5)**.

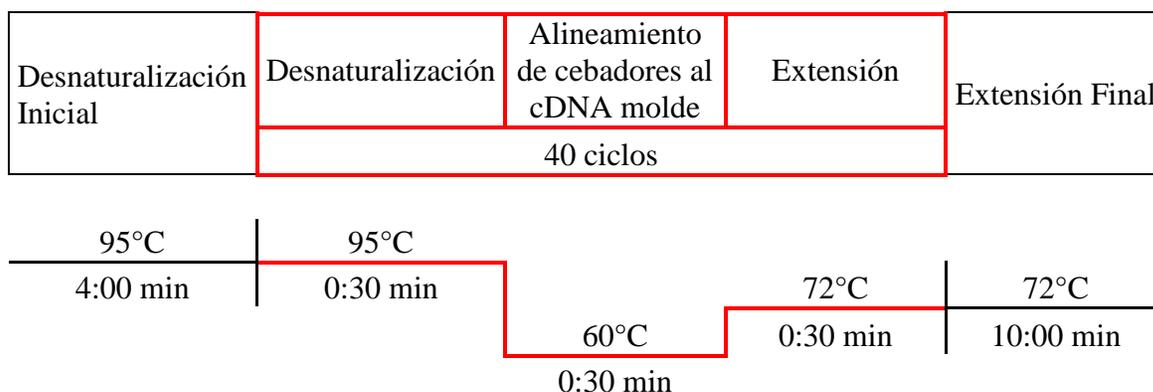


9. Extracción de RNA y reacción de amplificación mediante RT-qPCR

Para la extracción del RNA, los testículos se decapsularon y se aisló el RNA por medio del reactivo TRIzol® (invitrogen, USA). El RNA de cada muestra fue resuspendido en agua libre de RNAsas y almacenado a -80°C hasta su procesamiento. Inicialmente, la cuantificación de la concentración de RNA se midió por fluorímetro Quobit. Para definir la concentración de RNA a usar y para el análisis final de la integridad del RNA extraído, se determinó a todas las muestras su absorbancia a λ 260/280 en espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y por Bioanalizador 2100 (Agilent) respectivamente. En las muestras a analizar por secuenciación se utilizó un valor de RIN (estimador de la calidad del RNA extraído) superior a 9, mientras que para los ensayos de qPCR el RIN aceptado fue superior a 7 (**Figura 6**).

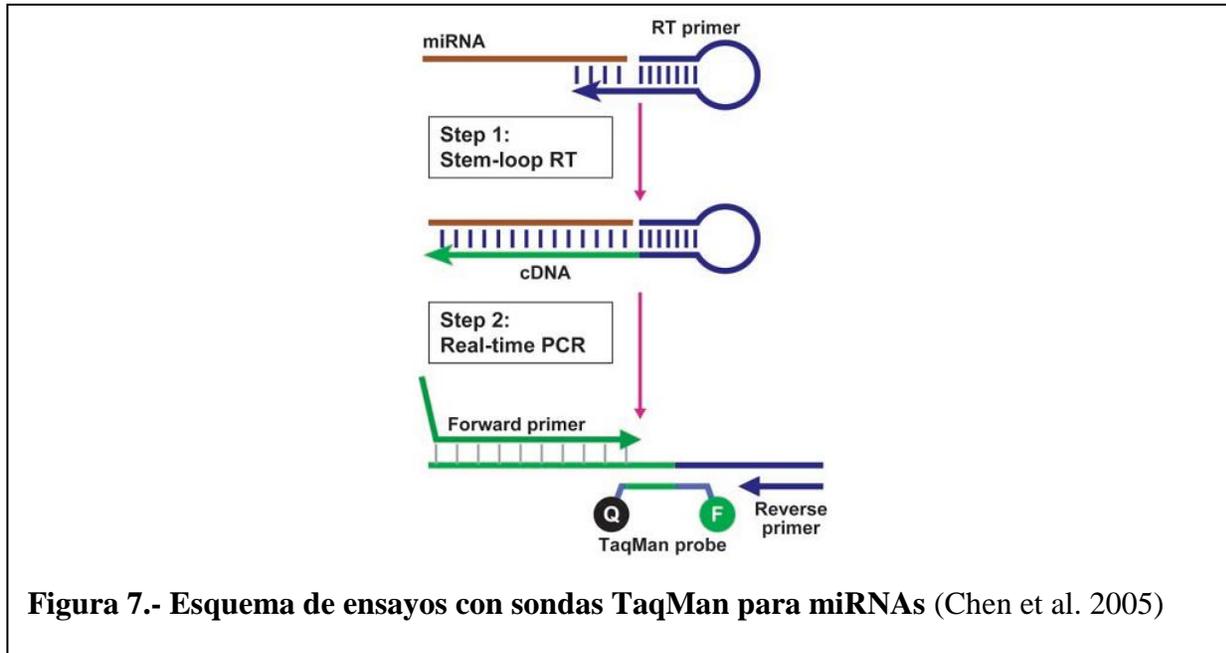


Para todos los ensayos por qPCR se utilizó 500 ng de RNA, para la retro-transcripción (RT) a cDNA, con 2.5 μM de OligodT₍₁₇₎, 1X First-Strand Buffer, 0,01 M de dithiothreitol (DTT), 0,1 mM de cada deoxiribonucleotido trifosfato (dNTP) y 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μl con agua libre de RNase, siguiendo el protocolo térmico sugerido por el fabricante. Una vez retrotranscritos los RNA a cDNA estos se amplificaron por variantes de la reacción en cadena de la polimerasa. Se usó 10 μl de 2x SYBR Green PCR supermix (Bio-Rad), como fluoroforo con afinidad por DNA, y cuya intensidad de fluorescencia incrementa proporcionalmente al número de moléculas de DNA de doble cadena producidas durante la amplificación. La reacción se llevó a cabo con 2 μl de cDNA y 0,0625 μM de cada cebador específico, en un volumen de reacción de 20 μl . La qPCR se desarrolló en un equipo de detección iQ5 (Bio-Rad, USA), utilizando 40 ciclos del siguiente protocolo térmico:



Para la determinación de la expresión de miRNAs maduros, se utilizaron las sondas de hidrólisis tipo TaqMan (Applied Biosystems). Las cuales emplean para la síntesis de la cadena complementaria al miRNA que se desea analizar, un cebador específico que se alinea

formando una región bucle, de tal forma que, por PCR sobre este bucle se alinea luego el cebador inverso complementario al miRNA que se desea analizar (**Figura 7**).



De este modo 500 ng de RNA fueron retro-transcritos usando el kit de transcripción reversa para TaqMan® real-time, Luego se desarrolló la qPCR con 2 µL del producto de retro-transcripción, 1× TaqMan® Universal PCR máster mix, y 1 µl de los cebadores específicos del kit para miRNAs TaqMan® Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo de detección Thermo-Fisher 7500 (Fast real time, USA), utilizando 40 ciclos del siguiente protocolo térmico:

Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineamiento de cebadores al DNA molde
	40 ciclos	
95°C 10:00 min	95°C 0:15 min	60°C 1:00 min

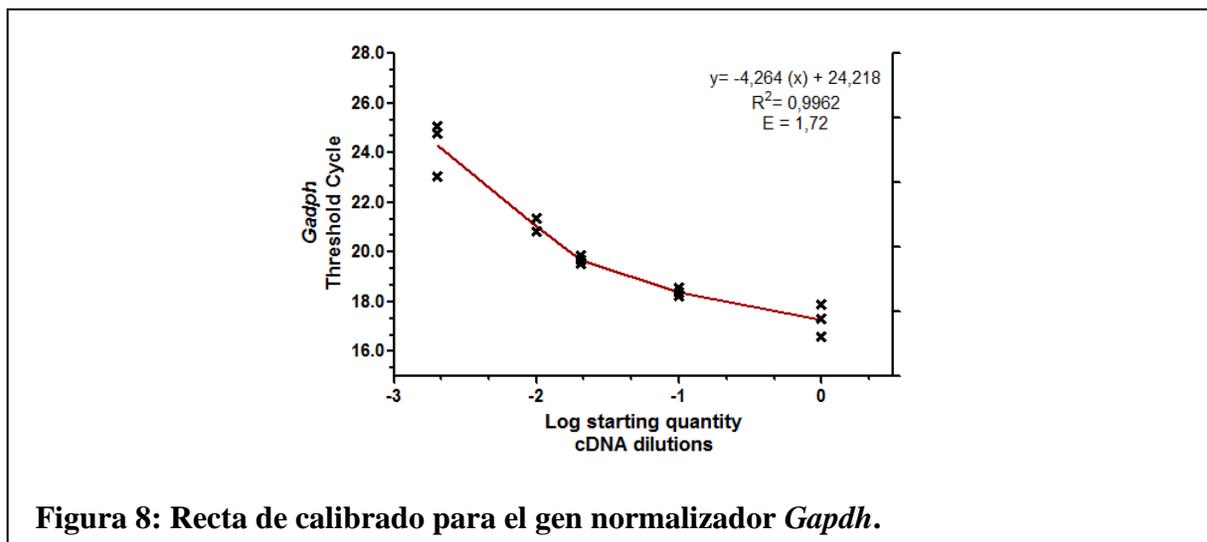
Para detectar los cambios en la expresión del mensajero se analizaron las curvas de disociación obtenidas, que son proporcionales a la cantidades de mensajero o transcrito presentes en las muestras y para la cuantificación relativa de los niveles de transcrito y/o mRNA, se usó el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen 2001; Schmittgen & Livak 2008). Este tipo de cuantificación mide los cambios en estado basal de un gen o transcrito de interés comparándolo con genes de expresión constante (genes de referencia), Para darle más robustez a los datos obtenidos por qPCR y dado que, se recomienda el uso de más de un gen endógeno de referencia para estudios que incluyan tratamientos toxicológicos, en tejidos sensibles como el testículo (Terje et al. 2015). En este trabajo se empleó para la normalización de nuestros datos de qPCR, la media geométrica de los niveles de mRNAs para los siguientes genes de referencia: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*), H2A miembro Z, de la familia de histonas (*H2afz*), Peptidilpropil isomerasa-A (*Ppia*). Y como gen de referencia para las formas maduras de miRNA se utilizo la expresión del snRNA-U6.

9.1 Calculo de la eficiencia de los cebadores empleados:

Dado que la determinación de la eficiencia de los cebadores a utilizar es particularmente importante en los ensayo por qPCR (Huggett et al. 2013). Como primera instancia decidimos evaluar la eficiencia de la pareja de cebadores que vamos a usar durante nuestra investigación. Definimos en nuestros ensayos una eficiencia 100% ($E= 2$), la cual indica la eficiencia con que la parejas de cebadores es capaz de duplicar la cantidad de producto (cDNA) por cada ciclo de amplificación, y aceptamos valores de eficiencias de hasta 1,7 como optimas.

Para llevarlo a cabo empleamos 500 ng de RNA de testículo de ratones adultos sin tratamientos (3 replicas biológicas) que fueron retro-transcritos a cDNA, y realizamos

diluciones en serie (1/10 - 1/50 - 1/100 - 1/500) partiendo de una concentración conocida de cDNA (1µg), empleando 3 replicas técnicas en cada ensayo. De este modo fabricamos curvas de calibrado para cada parejas de cebadores, donde el logaritmo de la concentración inicial del molde lo graficamos como variable independiente en el eje de las X y el ciclo de cuantificación (Cq) es graficado como variable dependiente en el eje de la Y. La eficiencia de la amplificación de una pareja de cebadores es determinada por la pendiente de la curva de calibración, dada por la siguiente ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ (**Figura 8**).



En la tabla 5 de la sección de materiales, se muestra los resultados del cálculo de la eficiencia para cada pareja de oligonucleótidos empleados.

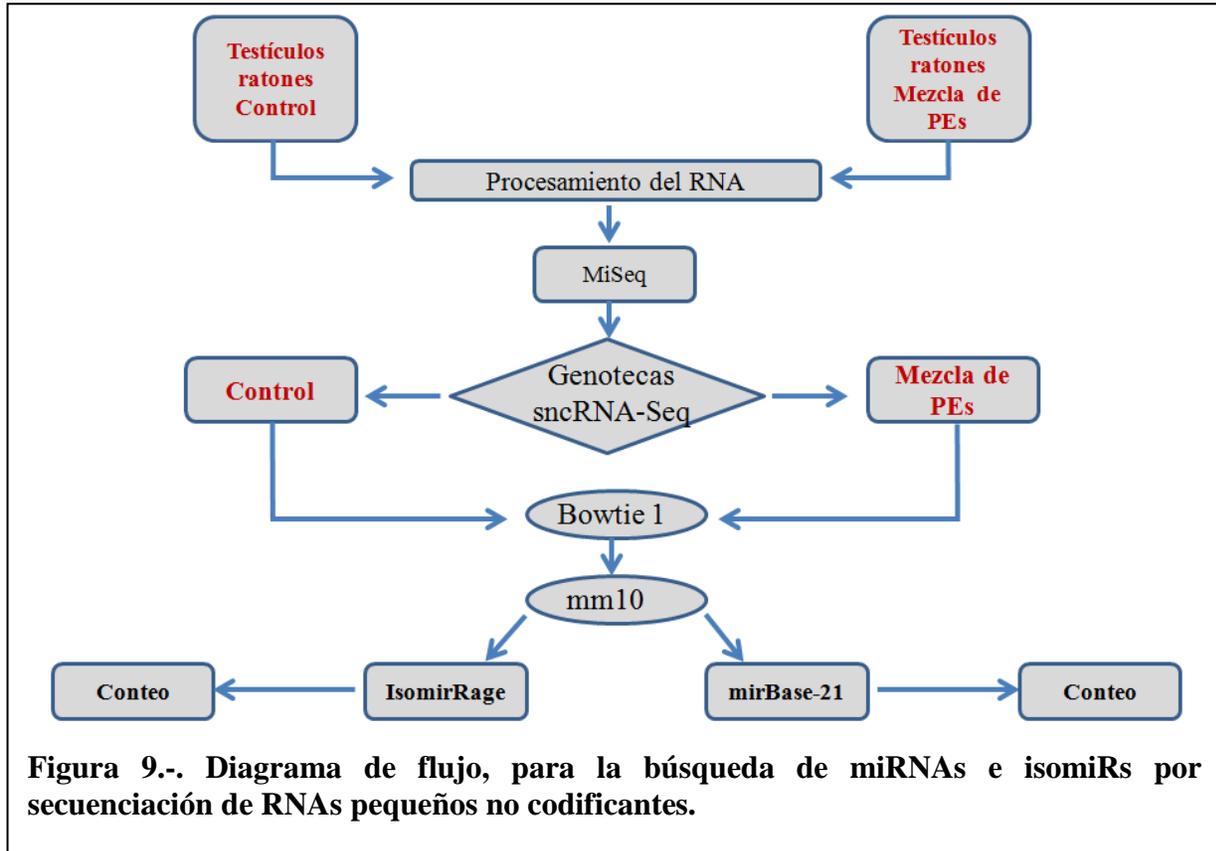
10. Análisis del *miRNoma* por secuenciación masiva de RNAs pequeños no codificantes (sncRNA-Seq).

Se diseñaron dos genotecas de secuenciación de RNAs pequeños no codificantes (small non coding RNA- Sequence (sncRNA-Seq)), con grupos de tres réplicas biológicas de 1.5 µg de RNA aislado de testículo de ratones adultos controles y tratados con la Mezcla de PEs

(RIN>9), siguiendo los protocolos de Illumina (disponibles en www.illumina.com/support). La empresa encargada de llevar a cabo la creación de las genotecas, a partir de los RNAs suministrados y analizados cualitativa y cuánticamente, fue *Next Generation Sequencing*, de la Fundación Parque Científico (Madrid-España). Se separaron las fracciones por electroforesis en geles de poliacrilamida, de las cuales las de un tamaño menor a 60 (pb) fueron seleccionadas y ligadas a oligonucleótidos (adaptadores) y amplificadas por PCR usando cebadores diseñados contra las secuencias de dichos adaptadores. Se corrieron las carreras de secuenciación en una sola línea, usando un MiSeq-Illumina sequencer® en cartuchos de 1X65 ciclos. Una vez recibidas las secuencias de las genotecas, mediante la plataforma cutadapt (Martin 2011) eliminamos de las secuencias los adaptadores y limpiamos las mismas retirando aquellas menores a 12 nucleótidos. Las calidades de las secuencias fueron examinadas usando el programa FastQC. Para el mapeo de miRNAs e isomiRs en las librerías de secuencia se usaron las siguientes estrategias (**Figura 9**):

- 1) Se uso Bowtie 1 como alineador para mapear las secuencias (Langmead et al. 2009), primero contra el genoma del ratón contenido en las bases de datos (mm10) descargado desde <http://www.ensembl.org/index.html>. Luego permitiendo hasta 3 errores de alineamiento, las secuencias fueron mapeadas contra la mirBase (versión 21) usando el siguiente desarrollo bioinformático (`bowtie -v3 -p6 -l 10 -k 1 -tryhard -strata -best -all -chunkmbs 256`). A continuación, se realizó la identificación y cuantificación de premiRNAs y miRNAs maduros utilizando HTSeq (Anders et al. 2015) y un archivo de formato GFF obtenido desde miRBase versión 21 (Kozomara & Griffiths-Jones 2014).
- 2) Para la detección de isomiRs, usamos la plataforma web IsomiRage (Muller et al. 2014).

Todos los archivos por muestra fueron reunidos en un único archivo que una las secuencias por genoteca, para luego continuar con los análisis de expresión diferencial.



11. Análisis Bioinformático

Para obtener una única lista de potenciales mRNAs dianas para los miRNAs diferencialmente expresados y así evitar la predicción de falsos positivos, usamos la base de datos de miRWalk, la cual combina la búsqueda de múltiples bases de datos de predicción de mRNAs dianas para miRNAs. De este modo, empleamos los datos de: miRanda – miRDB – RNA22 – TargetScan y mirWalk (Dweep et al. 2014). Solo aquellos mRNAs predichos por 3 o más bases de datos junto con los mRNAs dianas validados, fueron incluidos en los análisis. Para hacer aún más preciso nuestro abordaje *in silico*, solo seleccionamos mRNAs diana que fueran regulados por

un mínimo dos miRNAs. Posteriormente, usando los plugins de Cytoscape: ClueGO y CluePedia (Bindea et al. 2009; Bindea et al. 2013) realizamos un análisis de Ontología génica (GO) para los mRNAs dianas seleccionados, y determinamos los procesos biológicos y las funciones moleculares enriquecidas.

Finalmente para el análisis de redes y vías moleculares, usamos el software Ingenuity Pathway Analysis software (IPA) (Krämer et al. 2014), diseñando redes y buscando interacciones entre nuestros miRNAs diferencialmente expresados y sus mRNAs dianas o mRNAs reguladores, consultando la información obtenida en la memoria de IPA con los datos reportados exclusivamente en ratón y con los datos reportados para humano, ratón y rata.

12. Análisis Estadístico

Definimos como N biológico a las ratonas gestantes inicialmente expuestas desde el día 0.5 post-coito a los diferentes ftalatos y alquifenoles, sus mezclas o los controles respectivamente. De esta forma cada ratón macho proveniente de una misma madre (hermanos) fue considerado como una réplica biológica, y obligatoriamente para sumar un nuevo N biológico los ratones machos analizados deberían provenir de madres diferentes.

Para los distintos conteos, cuantificaciones, y medición de niveles proteicos, cada dato individual o el promedio de ellos fueron considerados como una variable independiente. Para los análisis de expresión de los mRNAs por qPCR, se realizaron cuatro replicas técnicas de cada una de las replicas experimentales. La estadística se analizó con el programa informático GraphPad Prim versión 5,0. Se analizaron las diferencias en las medias por los test no-paramétrico Mann Whitney, y no pareado. El análisis de varianza se realizó por ANOVA con

post-test Bonferroni y Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor menor igual a 0,05 y altamente significativos con un p-valor menor igual a 0,01 y 0,001.

Para la selección de los spots de interés en los geles bidimensionales, se utilizó el software PDQuest 8.0. Utilizando un análisis de regresión lineal (LOESS) se analizaron 246 spots y se seleccionaron 23 spots que cambiaban significativamente su expresión; de los cuales 18 fueron correctamente identificados en el análisis de sus masas trípticas.

Las lecturas de cada pre-miRNA, miRNA e isomiRs en las dos genotecas de secuenciación fueron previamente normalizadas por el número total de secuencias, expresándolos como porcentaje. Las secuencias mapeadas fueron primero normalizadas y para los análisis de expresión diferencial se utilizó la herramienta DESeq, contenida en el paquete bioinformático R, empleando un test de distribución binominal negativa y añadiendo un test de eliminación del 40% del cuartil más bajo (Anders et al. 2013; Anders & Huber 2010). Los valores de normalización obtenidos fueron para la genoteca de muestras control 1,066706 y para la genoteca de Mezcla de PEs 0,937413. De este modo, el número de secuencias diferentes se divide para sus correspondientes normalizadores en cada genoteca. Para expresar los resultados, se calculó la tasa de cambio de cada miRNA comparándolo con sus niveles de expresión en la muestra control y se aplicó el logaritmo en base 2 a cada uno de los datos. Para el agrupamiento jerárquico de los perfiles de expresión se utilizó como medida de similitud la distancia euclidiana y como medida de agrupamiento el ligamiento completo. Los mapas de calor que representan los perfiles de expresión de miRNAs e isomiRs normalizados obtenidos por sncRNA-Seq, se realizaron en el software MultiExperimental Viewer Version 4.1.

Para los análisis de enriquecimiento por ontología génica, usamos el software *ClueGO* que utiliza un test de distribución hipergeométrica con un umbral de p-value > 0.05.

RESULTADOS

1.- Caracterización de las alteraciones en la fisiología testicular en ratones machos expuestos de forma crónica a ftalatos y alquifenoles o sus mezclas.

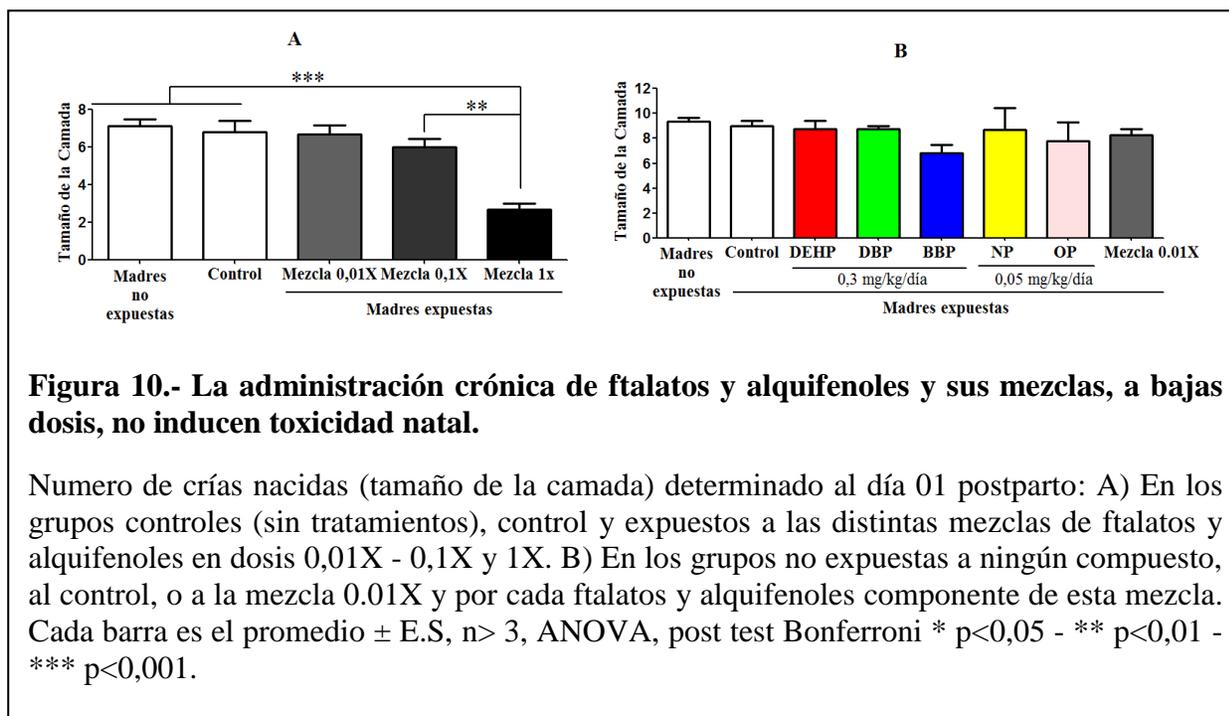
¿En qué dosis la exposición a ftalatos y alquifenoles o una mezcla de ellos, podrían tener efecto perturbador endocrino? ¿Cuáles son las consecuencias de una exposición crónica a estos compuestos o a una mezcla de ellos, sobre la fisiología reproductiva del hombre? Al inicio de nuestra investigación, se plantearon estas interrogantes, las cuales tienen mucha relevancia para la continuidad de la misma y para responder a la hipótesis. De esta forma, se diseñó un sistema de exposición crónica vía oral, a una mezcla definida de ftalatos y alquifenoles en ratones machos, el cual se podría acercar a las condiciones que están expuestas las poblaciones humanas en la vida cotidiana.

Primero ensayamos distintas concentraciones de nuestra mezcla, para definir si tendría efecto como perturbador endocrino sin producir toxicidad a nivel embrionario.

Dado que la toxicidad gestacional, reflejada en términos generales como una disminución en el número de crías nacidas (tamaño de la camada) es una medida directa y muy sensible para evaluar toxicidad de drogas y sus mezclas (ILO, 1998), se eligió este parámetro para determinar la posible toxicidad de la exposición crónica a los compuestos en evaluación.

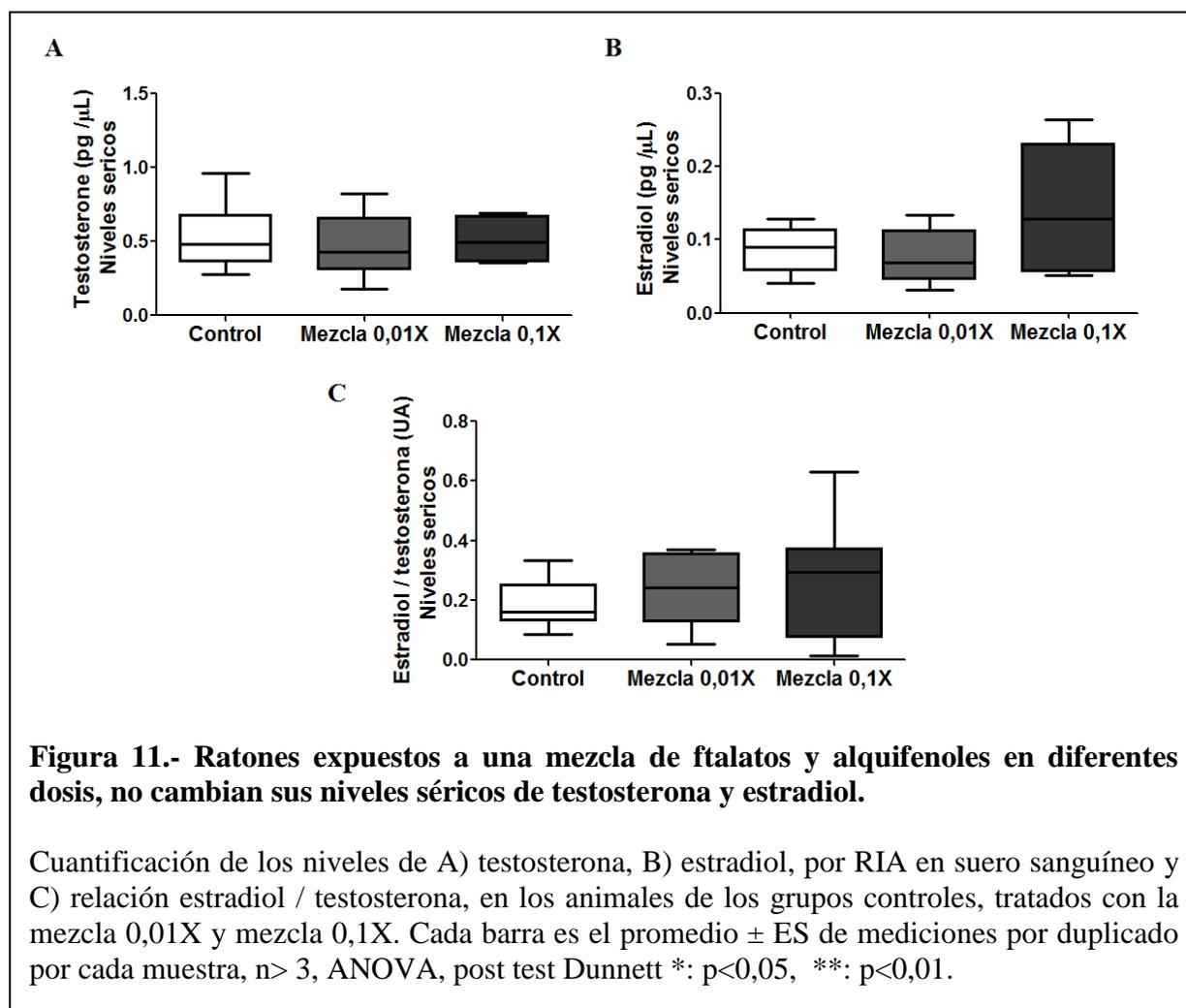
De esta forma, la mezcla llamada 1X (30mg/Kg/día de cada: DEHP, DBP, BBP y 5mg/Kg/día de cada: NP y OP) disminuyó significativamente el tamaño de la camada comparándolo con el control y con aquellos animales que no tenían ningún tipo de tratamiento. Por lo cual, no se siguió trabajando con esta mezcla por considerarla tóxica (**Figura 10A**).

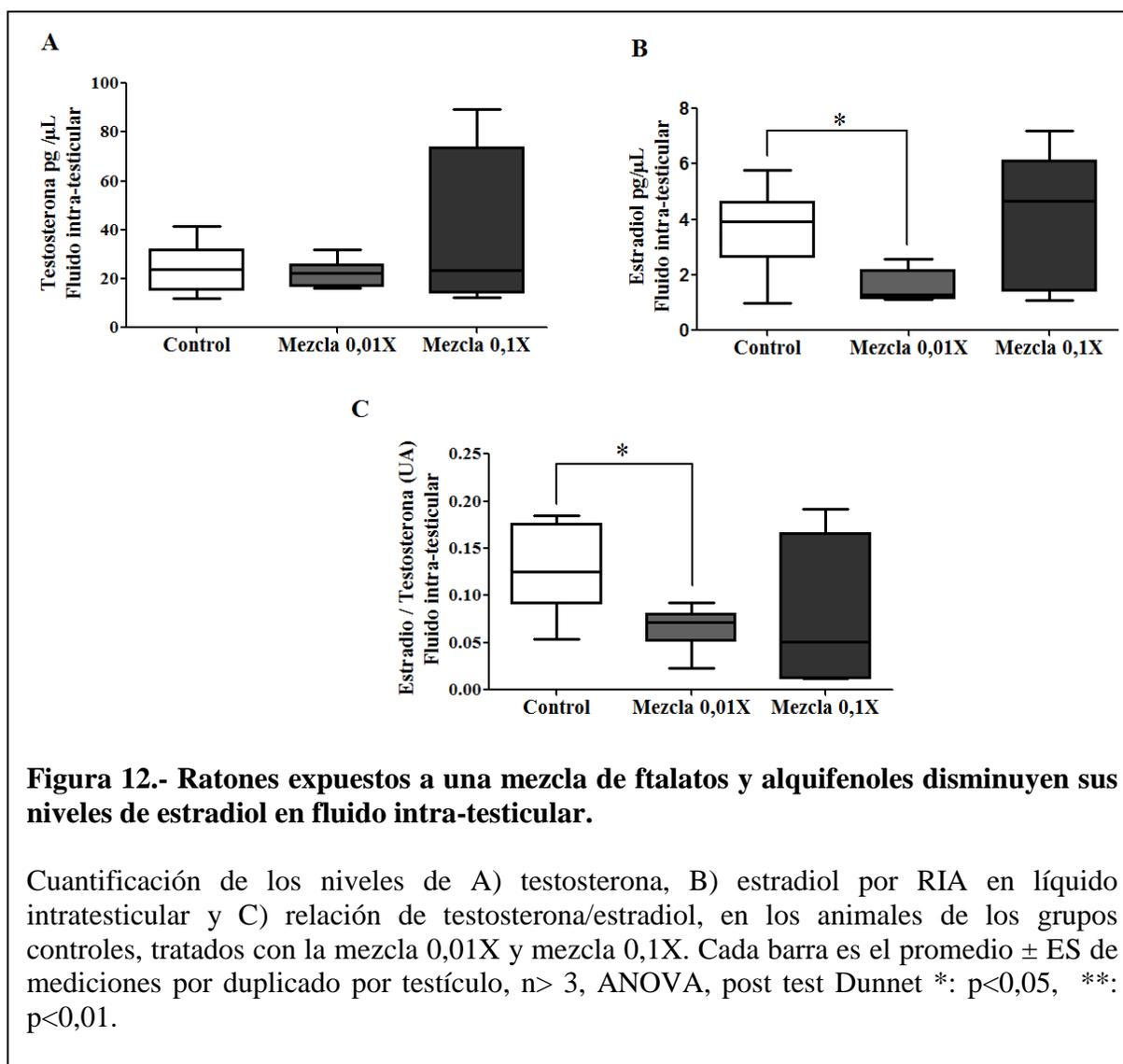
Dado estos resultados, resolvimos usar concentraciones 10 (3mg/Kg/día de DEHP, DBP, BBP y 0,5mg/Kg/día de NP y OP) y 100 veces menores (0,3mg/Kg/día de DEHP, DBP, BBP y 0,05mg/Kg/día de NP y OP) a la mezcla inicial 1X, llamadas: mezcla 0,1X y 0,01X respectivamente. Los resultados mostraron que el tamaño de la camada de las hembras con las mezclas 0,1X y 0,01X no fueron distintas significativamente a las del control ni a los animales sin ninguna exposición (**Figura 10A**). Por otro lado, también observamos que por exposiciones a los compuestos individualmente ningún ftalato ni alquifenol componentes de la mezcla 0,01X indujo disminución significativa del tamaño de la camada (**Figura 10B**). Por todo ello, continuamos nuestros estudios usando estas dos últimas dosis.



Una vez definida las dosis con que se trabajaría, analizamos su efecto después de la exposición durante toda la gestación, lactancia y hasta la edad adulta de los ratones macho. En el suero sanguíneo de los animales de 60/75 días, expuestos a los ftalatos y alquifenoles, no se

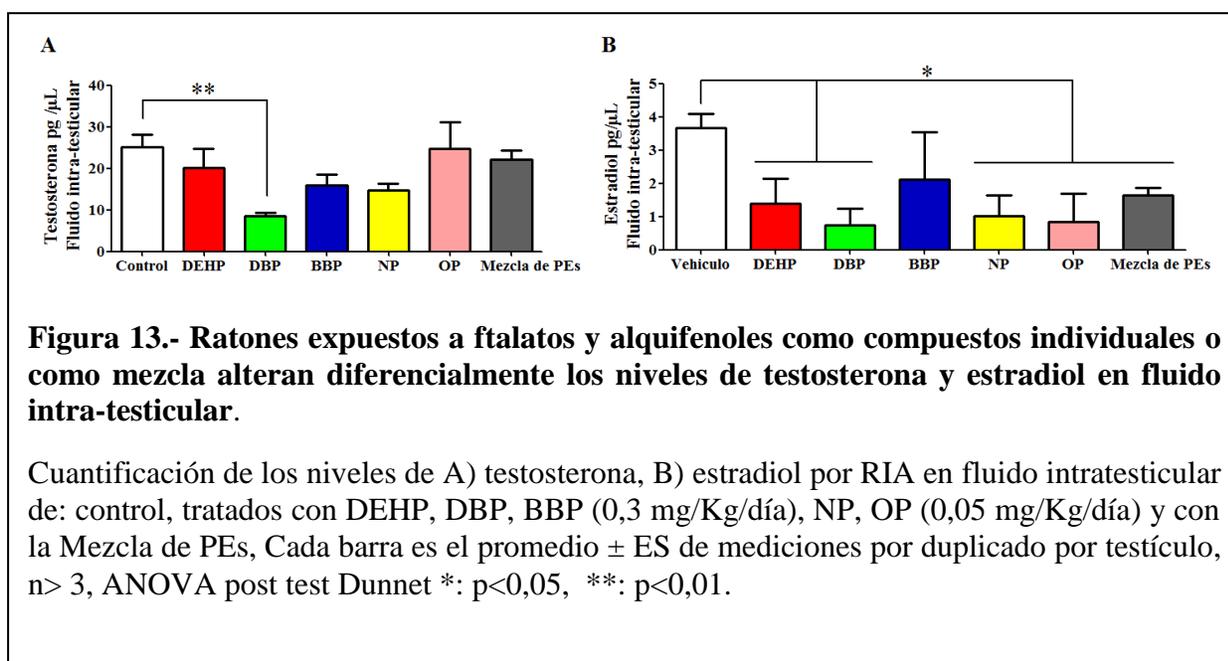
observaron cambios en los niveles de estradiol o testosterona, ni en el valor del cociente de E2/T con ninguno de los tratamientos. Los resultados de los niveles de testosterona en el fluido intratesticular fueron similares a los del plasma. Sin embargo, se observó una mayor variabilidad en los niveles de testosterona en los animales expuestos a la mezcla 0,1X que a la mezcla 0,01X, lo que sugiere que potencialmente distintas concentraciones de una mezcla podría afectar en forma diferencial a los individuos. Los niveles de estradiol en líquido intratesticular y el cocientes de estradiol / testosterona, se redujeron significativamente solo en los animales expuestos a la mezcla 0,01X (Figuras 11-12).





Estos resultados nos siguen indicando que la administración crónica de la mezcla 0,01X [(0,3mg/Kg/día de: DEHP, DBP, BBP), y (0,05mg/Kg/día de: NP, OP)] tendría una mayor acción como perturbador endocrino sobre los ratones machos. Ello indicaría un efecto de “dosis bajas” como se ha postulado para la acción no normotónica de algunos de los perturbadores endocrinos (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). **Por ello se continuó trabajando únicamente con esta mezcla de ftalatos y alquifenoles, y desde ahora en este trabajo se la señala como “Mezcla de PEs”.**

Dado que estamos trabajando con una mezcla de compuestos, es posible que los efectos observados sean dados principalmente por uno o algunos y no todos los compuestos, o por la interacciones entre ellos. Para dilucidar esto realizamos el mismo protocolo anterior, cuantificando los niveles intratesticulares de testosterona y estradiol en testículos de ratones adultos tratados individualmente con cada uno de los ftalatos y alquifenoles componentes de Mezcla de PES. Los datos señalaron que los niveles de testosterona disminuyeron significativamente solo en animales tratados con DBP, pese a que se observo una tendencia a la reducción en aquellos tratados con BBP y NP (**Figura 13A**). Por otra parte, los niveles de estradiol disminuyeron en los tratamientos con DEHP, DBP, NP, OP y con la mezcla de PEs (**figura 13B**). Estos resultados sugieren que en estas condiciones la Mezcla de PEs, así como la mayoría de sus componentes *DEP, DBP, NP y OP afectan los niveles de estradiol más que los de testosterona.

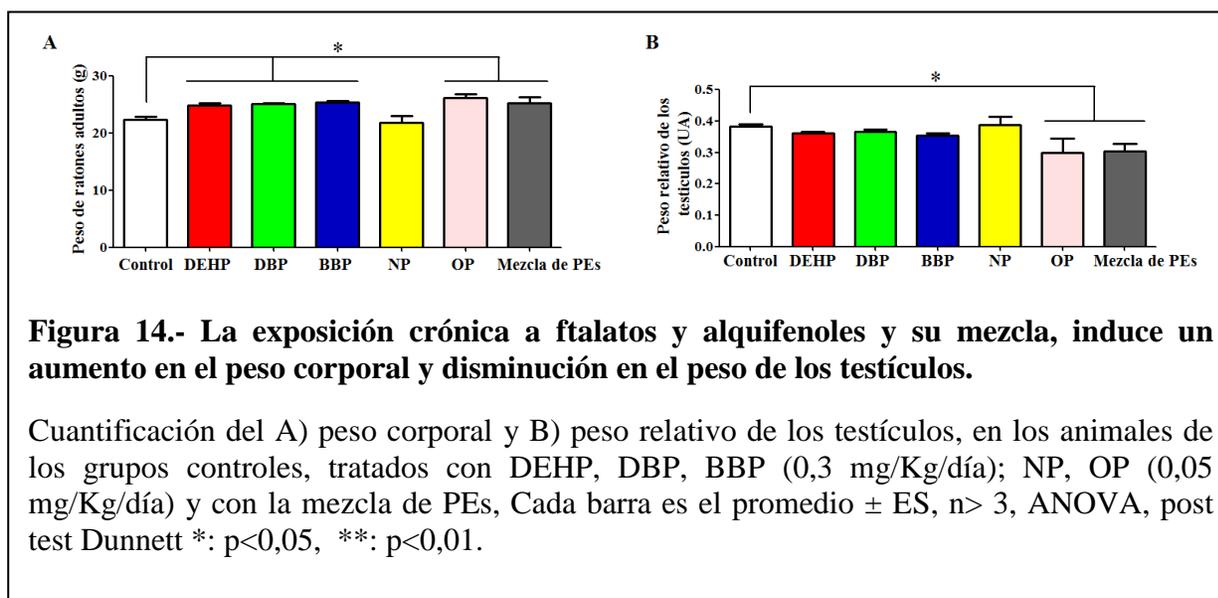


Dado estos datos, podemos decir que la mezcla de ftalatos y alquifenoles en las dosis indicadas actúan, de forma definida, como perturbadores endocrinos (PEs) y confirman que el efecto de mezclas de compuestos, de forma similar a la exposición por contaminación medioambiental, puede generar alteraciones diferentes o no detectadas en los modelos animales de exposición a compuestos individuales.

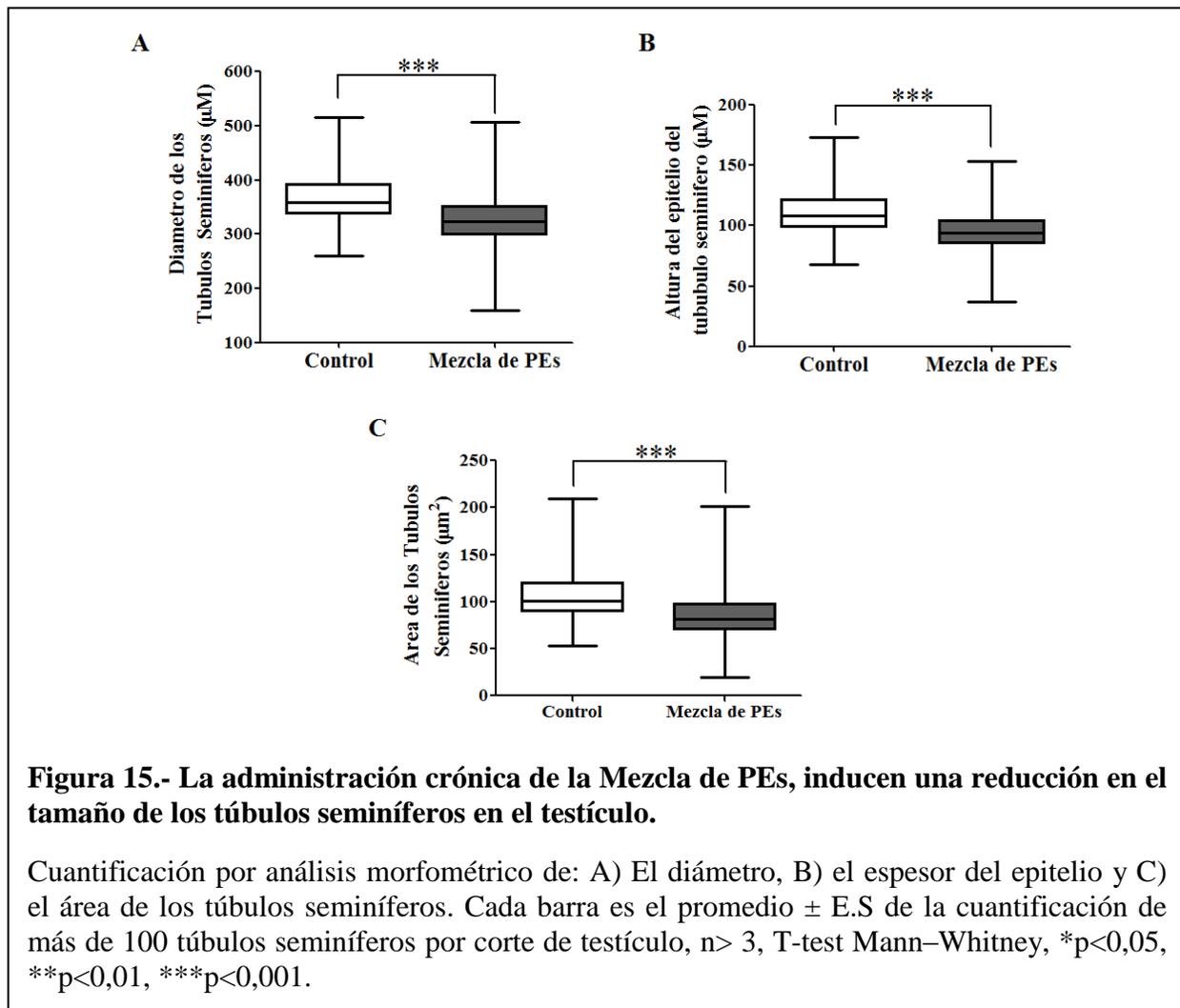
Dado que el testículo es un órgano endocrino por excelencia, la exposición a perturbadores endocrinos y la consecuente disminución de los niveles de estradiol, podrían tener severas consecuencias sobre la fisiología de este órgano. Por ello quisimos evaluar el efecto individual y de la mezcla sobre diversos parámetros de la fisiología reproductiva.

Primero se realizó una evaluación del índice gonadosomático (relación peso de los testículos/ peso corporal) y un análisis morfométrico. El peso corporal de los animales tratados con la mezcla de PEs y con los compuestos individuales, a excepción de NP aumento significativamente en relación al control (**Figura 14A**). Sin embargo, solo OP y la Mezcla de PEs redujeron significativamente el peso relativo de los testículos, desde $0,38 \pm 0,03$ para los animales expuestos solamente al control, a $0,30 \pm 0,11$ y $0,30 \pm 0,05$ para los animales expuestos a OP y la Mezcla de PE respectivamente (**Figura 14B**). Así pues, la sola presencia de OP parece inducir esta alteración en la exposición a la Mezcla de PEs.

Este dato señala un efecto obesogénico a la exposición de los ftalatos o alquifenoles empleados en este trabajo (excepto, NP). Sin embargo, solo la exposición a OP afecta el peso de los testículos. Al mismo tiempo, en los parámetros evaluados hasta ahora no se ha reflejado un efecto sinérgico o aditivo a la exposición de mezclas de ftalatos y alquifenoles.

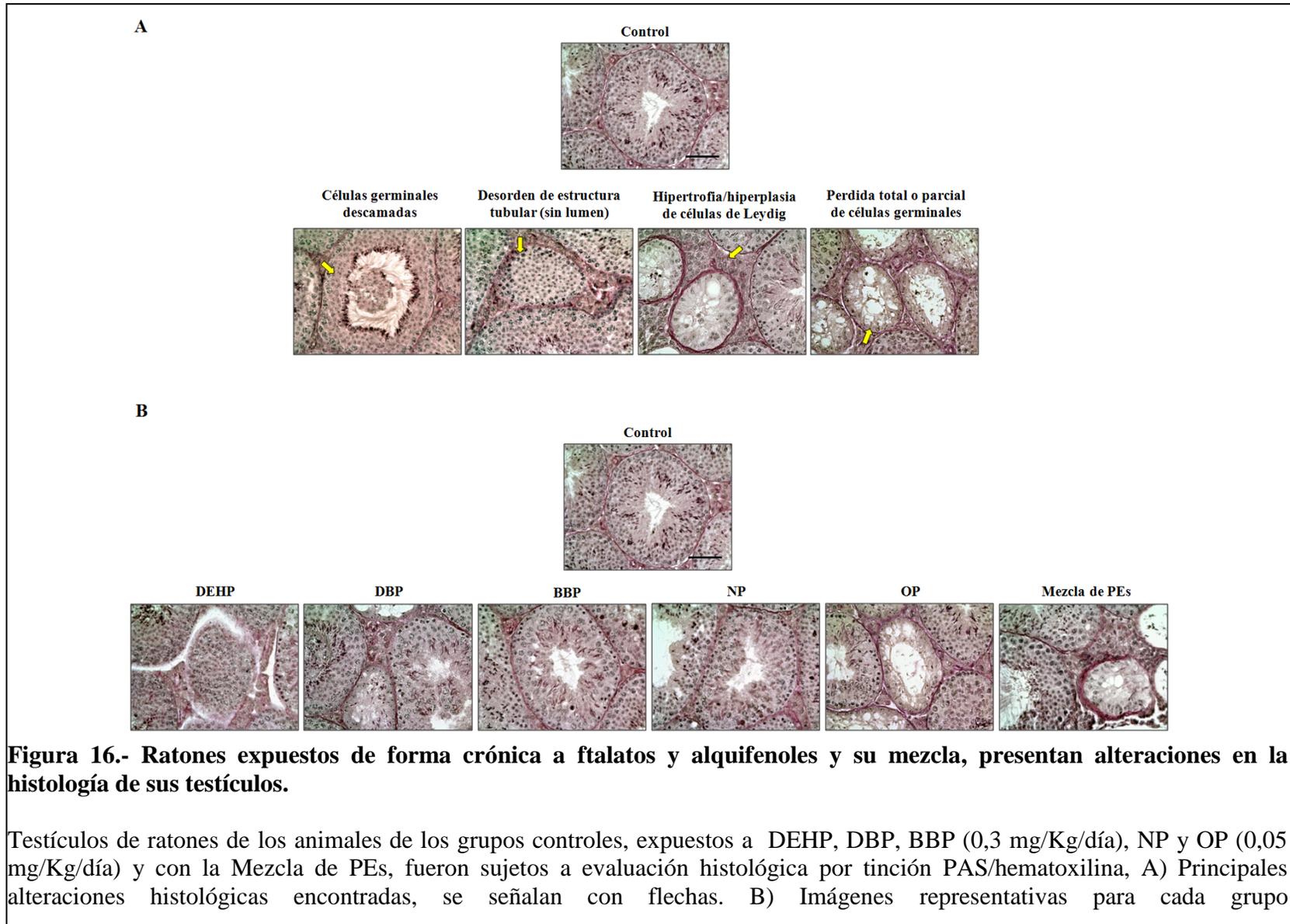


Para corroborar los resultados obtenidos de disminución del peso de los testículos en los animales expuestos a la Mezcla de PEs, se realizó un análisis morfométrico en cortes de testículos. El cual evidenció una disminución significativa en el diámetro de túbulos seminíferos, desde $366.3 \pm 2.06 \mu\text{m}$ para los controles a $327.4 \pm 1.87 \mu\text{m}$ en aquellos expuestos a la Mezcla de PEs. En el caso del espesor del epitelio también se observó una reducción desde $111.2 \pm 0.83 \mu\text{m}$ para los controles a $95.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ para los expuestos. En el caso del área de los túbulos seminíferos esta fue de $106.9 \pm 1.24 \mu\text{m}^2$ para los controles y se redujo a $85.48 \pm 0.9 \mu\text{m}^2$ en los expuestos (**Figura 15**).

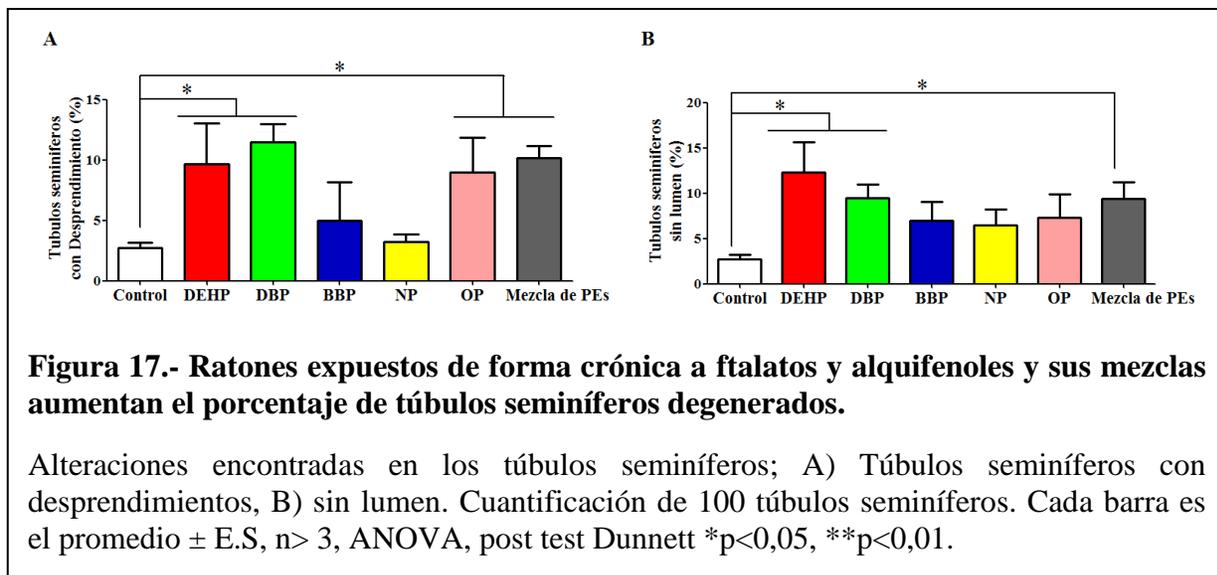


La evaluación al microscopio usando tinción PAS, evidenció diversos tipos de alteraciones en los túbulos seminíferos de los animales expuestos a los diferentes perturbadores endocrinos y/o la mezcla, estas alteraciones incluían:

- 1.- Agrupaciones celulares que podrían definirse como lesiones hiperplásicas e hipertróficas, en regiones del tejido intersticial donde se localizan la células de Leydig (**Figura 16A**).
- 2.- Degeneración/atrofia de los túbulos seminíferos dada la presencia de desorden en el epitelio del túbulo y pérdida del lumen, descamación de células germinales hacia el lumen del túbulo, y pérdida total o parcial de células germinales en diferenciación (**Figura 16A**).

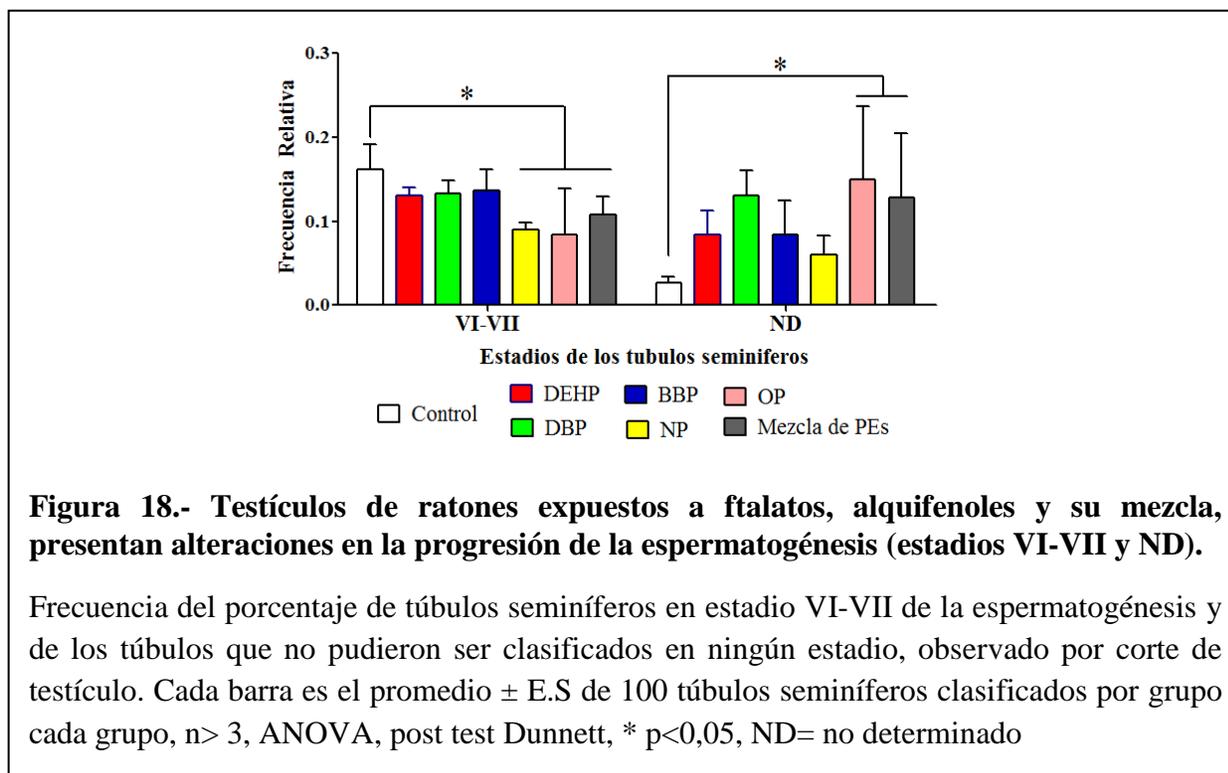


Cuantificando algunas de estas alteraciones, los datos mostraron que los animales expuestos a DEHP, DBP, OP y a la Mezcla de PEs presentaron un aumento significativo en el porcentaje de túbulos seminíferos con células desprendidas del epitelio del túbulo (**Figura 17A**). Del mismo modo, los datos mostraron que la exposición crónica a DEHP, DBP y a la Mezcla de PEs indujo un aumento significativo en el porcentaje de túbulos seminíferos con ausencia de lumen (**figura 17B**).



Otra posible consecuencia del daño a los testículos, inducido por la exposición a perturbadores endocrinos, es la alteración de la progresión de la espermatogénesis. Lo cual está en directa correlación con la producción de espermatozoides y con patologías que inducen infertilidad. Para verificar si la progresión de la espermatogénesis se encuentra alterada, se cuantifico la frecuencia en la cual un túbulo seminífero se encontraba en un estadio de la espermatogénesis determinado, en los cortes de testículos de las muestras expuestas a controles comparados con los expuestos a ftalatos, alquifenoles o su mezcla. Sin embargo, en este apartado se señalan los estadios VI y VII, dado que en el ratón ellos son los más susceptibles a las alteraciones

hormonales y es donde se produce la espermiación (liberación de los espermatozoides al lumen del túbulo (Russell 1990), mientras que como anexo señalamos la frecuencia de todos los estadios cuantificados. Los datos revelaron que hubo una disminución en la frecuencia de los estadios VI y VII en los testículos de ratones expuestos a los alquifenoles NP, OP y a la Mezcla de PEs, pero no con el grupo de ftalatos. Al mismo tiempo, hay un aumento en la proporción de túbulos seminíferos que no pudieron ser clasificados en estadios específicos, en los grupos tratados con OP y con la Mezcla de PEs comparándolos con la frecuencia de los estadios de los animales del grupo control (**Figura 18 y anexo I- Figura 19**).

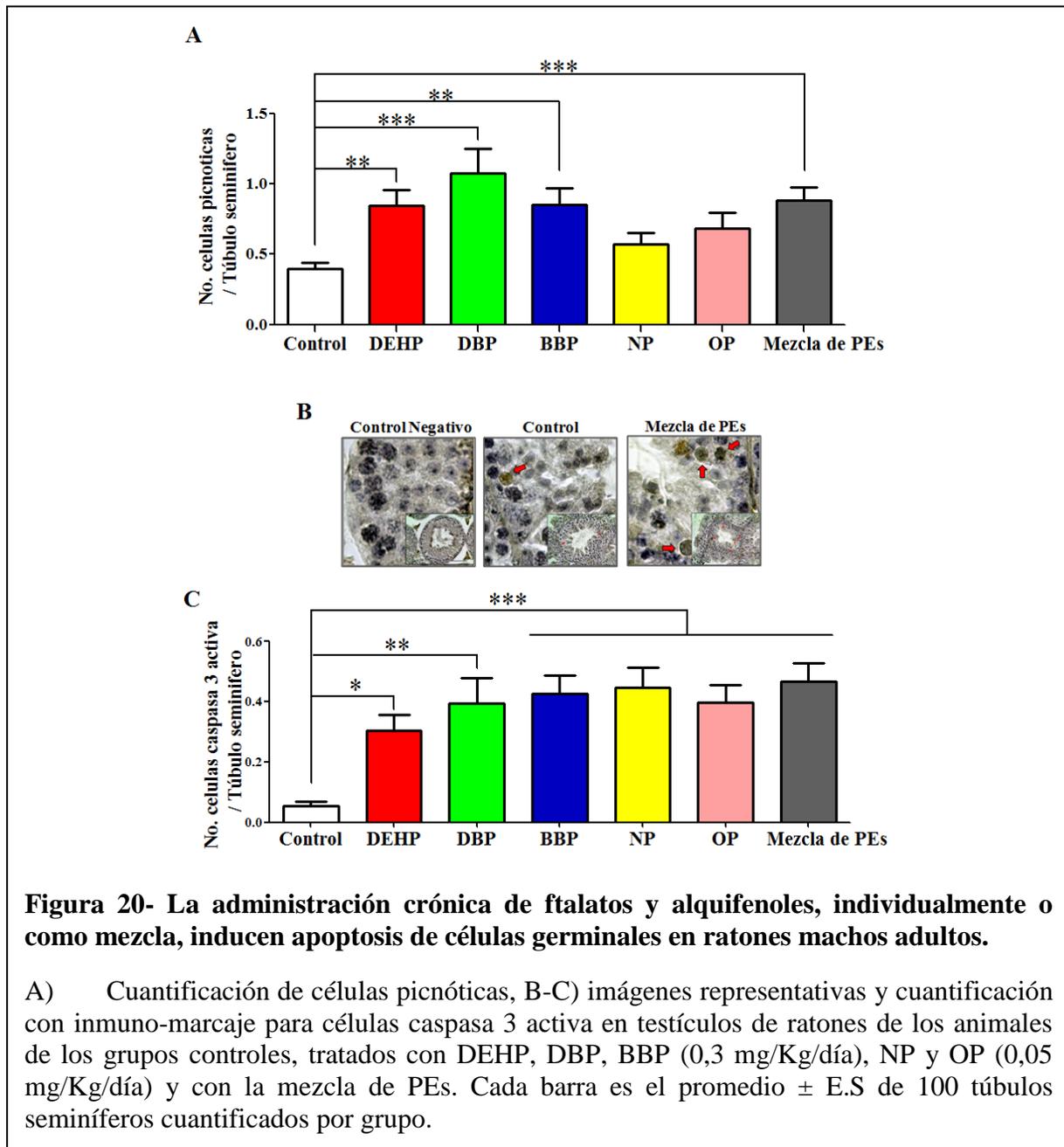


Recopilando hasta ahora estos datos, podemos señalar que, la exposición a los ftalatos y alquifenoles de manera individual o como mezcla, induce una degeneración de los túbulos seminíferos que estaría alterando la progresión de la espermatogénesis, lo que podría llevar a una producción alterada de espermatozoides o problemas reproductivos.

En la literatura, está descrita la correlación que existe entre un aumento de la apoptosis de células germinales y distintos grados de alteraciones del testículo, los cuales conllevan a potenciales problemas de fertilidad. Por esta razón, se quiso establecer si la exposición crónica a ftalatos y alquifenoles de forma individual o como mezcla induce apoptosis de células germinales. Los datos mostraron que existe un incremento significativo en el índice apoptótico determinado por conteo de células picnóticas (células en proceso de muerte, descritas con un gran tamaño y con núcleos muy condensados), únicamente en los testículos de ratones que fueron expuestos a ftalatos (DEHP, DBP, BBP) y a la Mezcla de PEs (**Figura 20A**).

Para estudiar más de cerca el tipo de muerte celular que se estaría induciendo por estos compuestos, usamos como marcadores de apoptosis la inmunoreacción para la caspasa 3 activa. Se observó en los mismos cortes de testículo un incremento significativo, respecto a los controles, en el número de células caspasa 3 activa/túbulo seminífero con todos los ftalatos, alquifenoles ensayados y para la mezcla de ellos. Por su localización en los túbulos seminíferos, se sigue que mayoritariamente espermatocitos y espermatidas redondas estarían aumentando su tasa de apoptosis (**Figura 20B-C**).

Estos datos sugieren que los ftalatos y alquifenoles o su mezcla inducen muerte de células germinales, principalmente por apoptosis. Sin embargo, las diferencias entre el efecto de compuestos individualmente o como mezcla, en las diferentes técnicas para evaluar apoptosis, podría asociarse, además del efecto intrínseco de cada compuesto o de la mezcla, a la presencia de otros tipos de muerte celular, así como en la dinámica de progresión a la inducción de apoptosis por cada tratamiento.



Finalmente, evaluamos la fertilidad en ratones machos. Los datos mostraron que no hay diferencias significativas en todos los parámetros reproductivos medidos, (tasa gestacional, índice de fecundidad y potencial de fertilidad) entre los animales controles y los expuestos a la mezcla de PEs (**Tabla 9**). Sin embargo, los datos señalaron que existían diferencias

significativas en las varianzas en ciertos parámetros, entre los grupos de animales expuestos a la mezcla de PEs comparándolas con los controles. Señalando una tendencia de reducción del potencial de fertilidad, dado que en los mismos animales existió la tendencia a aumentar el número de pérdidas pre-implantación, y del número de reabsorciones. Esto sugiere que existen poblaciones de animales cuya fertilidad puede estar más comprometida, probablemente por variaciones sutiles en la exposición a la Mezcla de PEs durante alguna ventana sensible del desarrollo de la gónada (**Figura 21**).

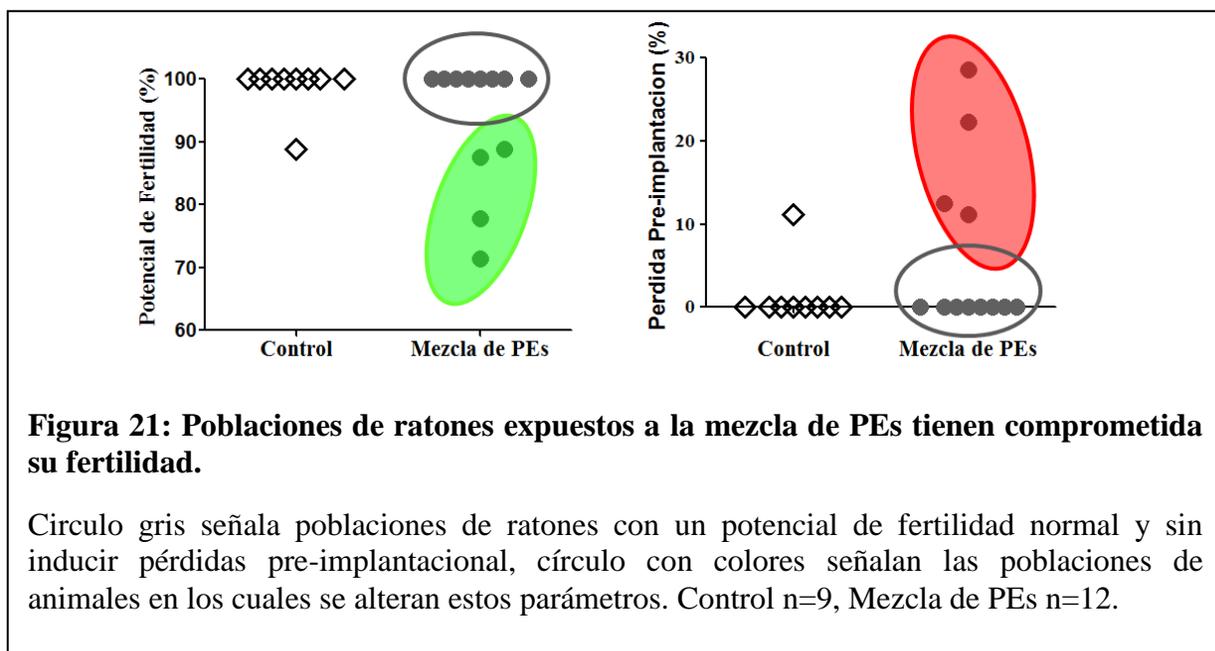


Tabla 9: Ratones machos expuestos a la Mezcla de PEs, no presentan cambios significativos en sus parámetros de fertilidad.

Parámetro	Control (N=9)	Mezcla de PE (N=12)	p-valué
Tasa gestacional (%) *	100 ± 0.00	100 ± 0.00 ^a	ns
Índice de fecundidad (%) *	100 ± 0.00	100 ± 0.00 ^a	ns
Potencial de fertilidad (%) **	98,77 ± 3,70	93,8 ± 10,13 ^a	ns
No. de implantaciones al día Gestacional 20	7,40 ± 1,41	7,92 ± 1,38 ^a	ns
No. de reabsorciones al día gestacional 20	0,25 ± 0,47	0,46 ± 0,67 ^a	ns
Perdidas pre-implantacional (%) **	1,24 ± 3,70	6,2 ± 10,13 ^a	ns
Mortalidad fetal	0,03 ± 0,06	0,08 ± 0,12 ^a	ns
los datos son expresados como el promedio ± ES			
* Test chi-cuadrado			
** T-test no pareado			
ns= no significativo			
N= ratones machos adultos cruzados con dos hembras no expuestas a ningún tratamiento			
^a Significativamente igual al control			
^b Significativamente diferente al control			
Tasa gestacional: (No. de hembras preñadas / No de hembras expuestas a la cruce)*100			
Índice de fecundidad: (No de machos que engendraron al menos un feto viable / No. De machos expuestos a la cruce)*100			
Potencial de fertilidad: (No. de implantaciones / No. de cuerpos lúteos)*100			
Pérdida pre-implantacional: (No. de cuerpos lúteos - No. de implantaciones) / (No. de cuerpos lúteos)*100			
Índice de mortalidad fetal: (No. de reabsorciones / No. de implantaciones)*100			

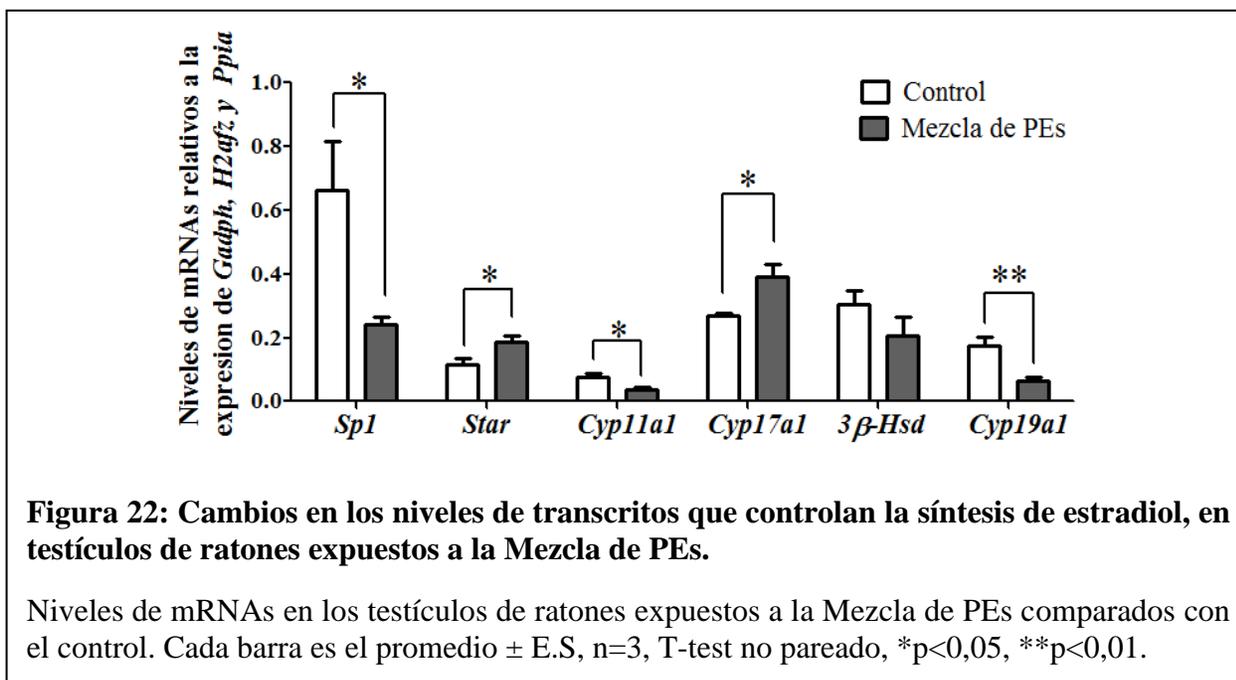
Hasta ahora, hemos podido asociar la reducción del contenido de estradiol testicular con las alteraciones histológicas, disminución en la progresión de la espermatogénesis y apoptosis de células germinales. Respecto a la primera alteración, es inevitable preguntarse: ¿Qué mecanismos están implicados en la reducción de estradiol?

Evidencias en la literatura han señalado que la exposición a perturbadores endocrinos inducen cambios en la expresión de enzimas de la vía esteroidogénica y este sería el mecanismo que mediaría alteraciones en los niveles hormonales (Svechnikov et al. 2010). Nosotros creemos necesario comprobar si la exposición a nuestra Mezcla de PEs altera la expresión de estas enzimas y para ello abordamos el próximo objetivo.

2. Evaluar si la exposición crónica a ftalatos, alquifenoles o su mezcla, alteran la expresión de enzimas de la vía esteroidogénica.

Los datos anteriores mostraron que la Mezcla de PEs inducía una reducción significativa de los niveles de estradiol en líquido intratesticular. En los testículos de mamíferos, la biosíntesis de estrógenos está regulada por la expresión de diversos elementos como: factores de transcripción (*Sp1*), transportadores de colesterol a la mitocondria (*Star*) y de enzimas de la vía esteroidogénica como *Cyp11a1*, 3β -Hsd, *Cyp17a1* y *Cyp19a1*. Por tal motivo, llevamos a cabo un análisis de los niveles de los transcritos de estas proteínas, en testículos de ratones adultos expuestos a los ftalatos, alquifenoles o su mezcla, comparándolos con los controles.

Los resultados mostraron que, en los animales expuestos a la Mezcla de PEs los niveles de acumulación de los transcritos *Sp1*, *Cyp11a1* y *Cyp19a1* disminuyeron significativamente, mientras que los de *Star* y *Cyp17a1* aumentaron, y los niveles del transcrito para la enzima 3β -Hsd no se alteraron por el tratamiento (**Figura 22**).



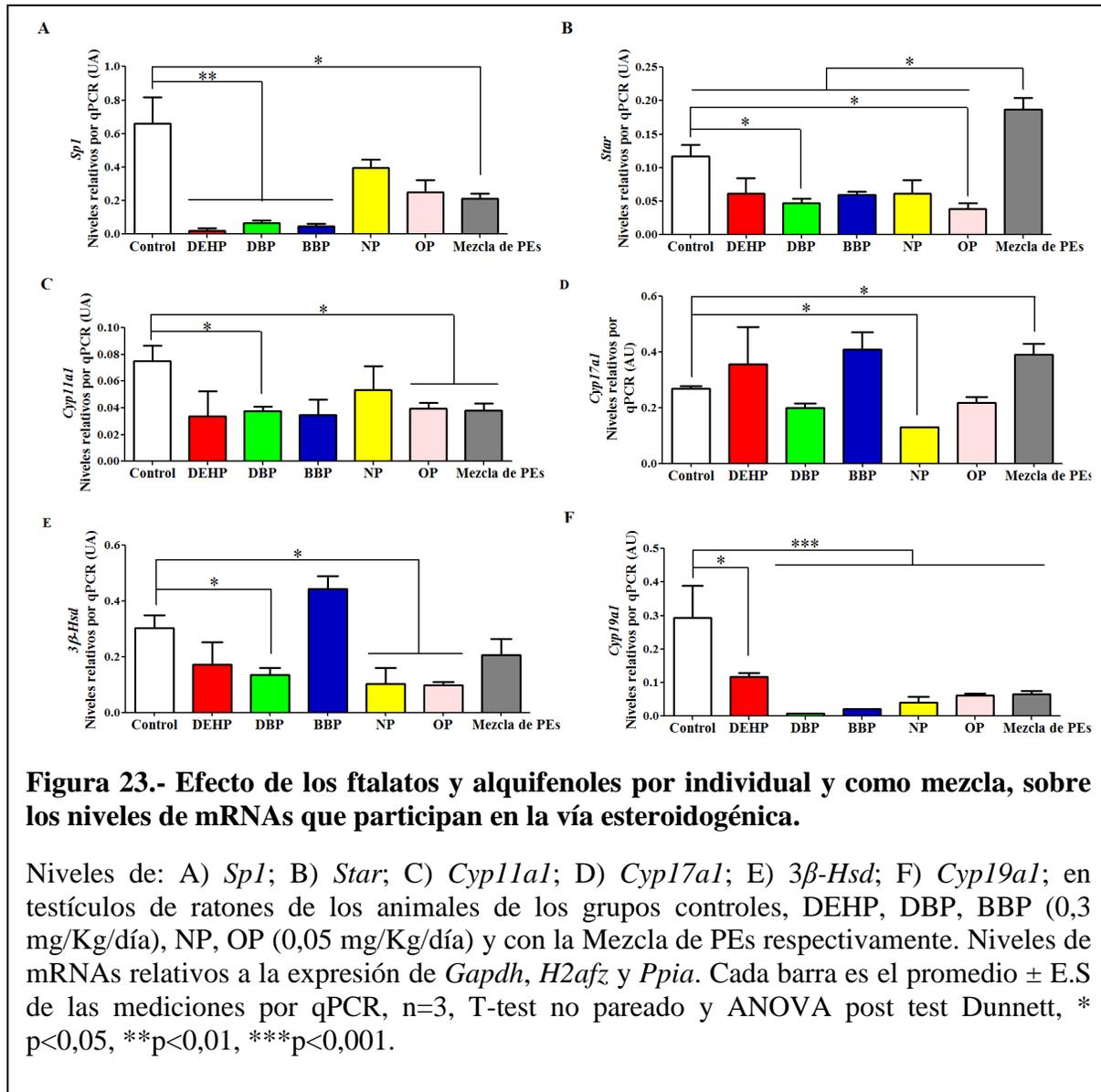
A continuación se analizaron los datos obtenidos para los niveles de mensajero de los transcritos evaluados anteriormente, en los animales expuestos de forma individual a cada uno de los ftalatos y alquifenoles componentes de la mezcla (**Figura 23, anexo I-Tabla 10**).

De forma general, se observó lo siguiente:

- 1) Cualquiera de los ftalatos y alquifenoles empleados inducen cambios a nivel de los mensajeros en al menos dos de los transcritos evaluados.
- 2) Ninguno de los ftalatos y alquifenoles evaluados ya sea de forma individual o como mezcla, induce cambios en todos los transcritos evaluados.
- 3) La exposición a ftalatos y alquifenoles disminuye los niveles de los mensajeros evaluados. A excepción del aumento de los niveles de *Star* y *Cyp17a1* únicamente frente a la Mezcla de PEs.
- 4) El ftalato DBP alteró la mayor cantidad de transcritos (5 genes alterados de un total de 6 analizados) seguido por el alquifenol OP (4 genes alterados de un total de 6 analizados).
- 5) Con la excepción del mensajero para *Star* y para *Cyp17a1*, los cambios en los niveles de los otros mensajeros evaluados, inducidos por los ftalatos y alquifenoles componentes de la mezcla se relacionan con los cambios producidos por la mezcla.
- 6) El ftalato DBP como los alquifenoles NP y OP disminuyen significativamente los niveles de *3 β -Hsd*. Sin embargo, ese efecto no se ve reflejado cuando se administra la mezcla.
- 7) Para los niveles de mensajero de *Cyp19a1*, se observó que todos los ftalatos y alquifenoles empleados lo redujeron significativamente. Por consiguiente el efecto de

la mezcla puede ser inducido por cualquiera de sus componentes, siendo este transcrito potencialmente más sensible a la acción de la Mezcla de PEs.

- 8) Finalmente, en ninguno de los mensajeros evaluados se observa un efecto aditivo o sinérgico de la mezcla en comparación con los ftalatos y alquifenoles individualmente.



Dado que la enzima aromatasa (*Cyp19a1*) es clave para la síntesis de estradiol a partir de testosterona se evaluó en qué periodo del desarrollo del testículo de ratón se podría detectar la disminución en el transcrito de esta enzima, inducido por la Mezcla de PEs.

Para ello, utilizamos RNA aislado de gónadas de ratones de 14,5 días postcoital, 3 días postnatales y adultos (todos expuestos a los tratamientos desde el primer día de la concepción) y evaluamos la expresión de *Cyp19a1*. Los resultados mostraron que los niveles de mensajero para aromatasa fueron similares entre los embriones de 14,5pc expuestos a los controles y a la Mezcla de PEs. Sin embargo, los niveles del transcrito disminuyeron significativamente en ratones de 3 días y adultos de 60 días de edad (**Figura 24**).

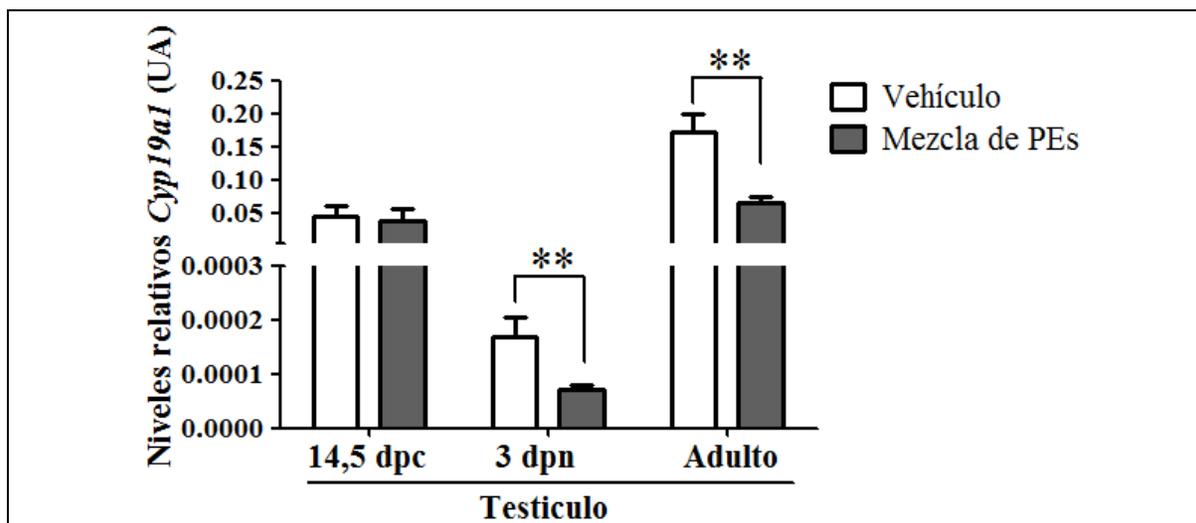
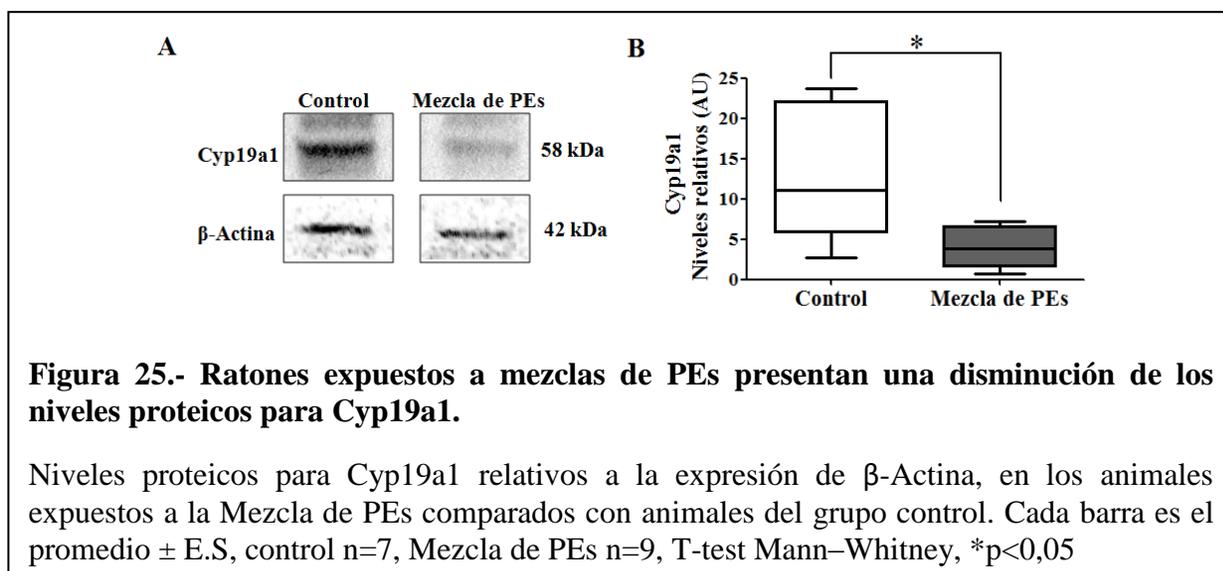


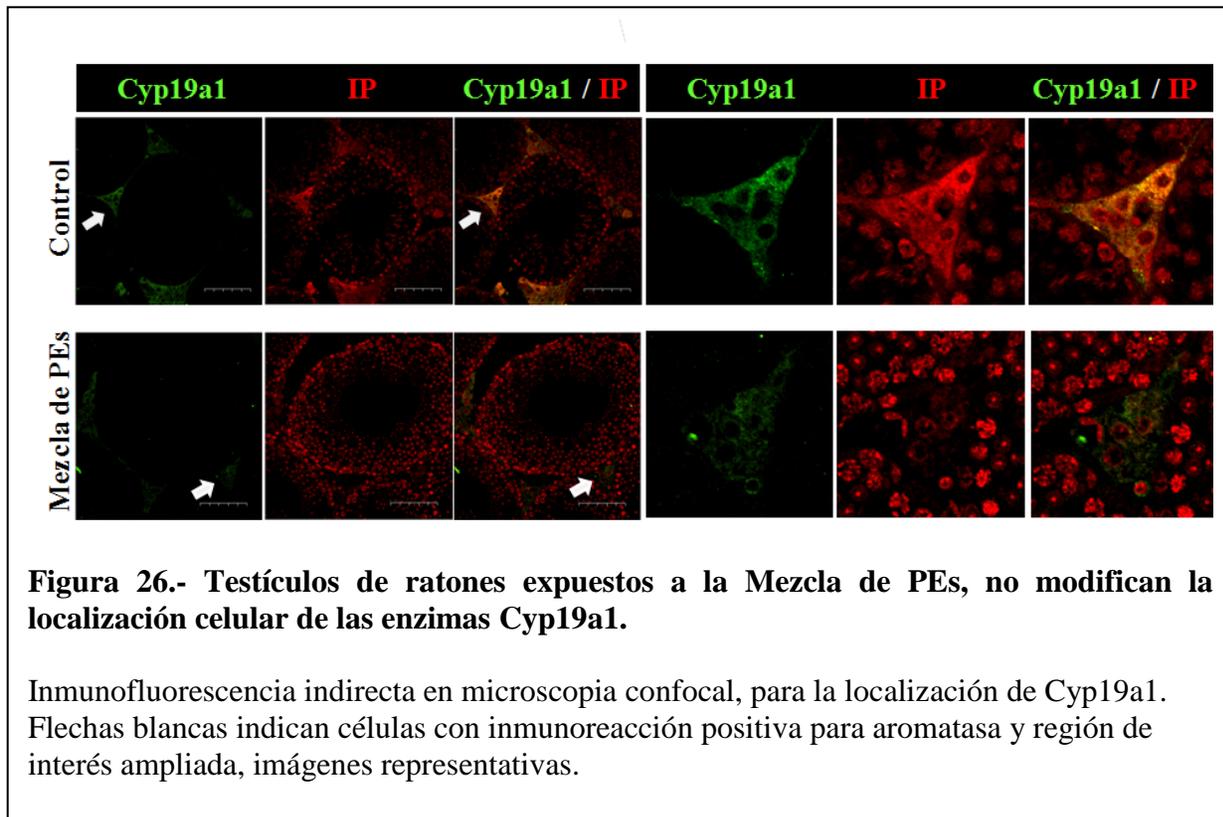
Figura 24.- La disminución de los niveles de mensajero de aromatasa inducida por la Mezcla de PEs comienza a reflejarse en ratones neonatos.

Niveles de *Cyp19a1*, en gónadas de embriones machos de 14,5 días, en testículos de ratones neonatos de 3 días y testículos de ratones adultos de 60 días, para los animales expuestos a la Mezcla de PEs comparados con animales del grupo control. Niveles de mRNAs relativos a la expresión de *Gapdh*, *H2afz* y *Ppia*. Cada barra es el promedio \pm E.S, $n > 3$, T-test Mann-Whitney, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Estos resultados indican que la Mezcla de PEs no altera la síntesis de estradiol en la gónada fetal, sino que este proceso comenzaría en los testículos de los ratones neonatos y persiste en animales adultos, lo cual se podría asociar con la proliferación de la población de células de Leydig adultas, al inicio de la espermatogénesis. Además, la disminución de *Cyp19a1* desde los 3 días de edad, es un evento molecular inicial que se observa alterado y que podría explicar en parte las alteraciones en el fenotipo en los testículos de ratones adultos, inducido por la exposición a la Mezcla de PEs.

Para corroborar si los cambios que observamos a nivel del transcrito de *Cyp19a1* se reflejan a nivel proteico, quisimos determinar si los niveles proteicos y la localización subcelular de la enzima aromatasa (*Cyp19a1*) se vieron afectados por la exposición a la Mezcla de PEs. Los datos mostraron que la enzima aromatasa disminuyó significativamente en los testículos de ratones adultos que fueron expuestos hasta los 75 días de edad (**Figura 25-26**). En estos mismos animales, la localización subcelular de *Cyp19a1* se mantiene inalterada, observando inmuno-marcaje solo en las células que se localizan alrededor del túbulo seminífero, las cuales corresponderían a células de Leydig principalmente (**Figura 26**).





En resumen, la disminución del estradiol intratesticular por la exposición a la Mezcla de PEs, ocurre mediada por cambios en la expresión de diversos transcritos que participan en la vía esteroidogénica (en especial *Cyp19a1*) y que se empezarían a reflejar en los ratones neonatos. En este proceso, tal como fue señalado en el apartado de introducción, puede estar involucrada la regulación pos-transcripcional mediada por los miRNAs. A su vez, la expresión de miRNAs dependerá de sus mecanismos de biogénesis, procesamiento y regulación. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si algunos de los elementos que forman parte de estos mecanismos, pueden verse afectados por mezclas de ftalatos y alquifenoles. Por ello, para intentar obtener alguna evidencia al respecto nos decidimos abordar el tercer objetivo.

3.- Determinar si mezclas de ftalatos y alquifenoles alteran moléculas implicadas en la biogénesis, procesamiento, edición, regulación y degradación de miRNAs

Al ser esta una primera aproximación, se evaluaron cambios en los niveles de transcritos que codifican proteínas encargadas de los procesos canónicos de: biogénesis (*Drosha*), transporte del núcleo a citoplasma (*Xpo-5*), edición (*Adar-1S*), procesamiento (*Dicer*, y *Ago-2*), estabilidad/ regulación (*Lin28b*, *Tut-4* y *Tut-7*) y degradación (*Snd1*, que codifica a la proteína Tudor-SN) de miRNAs.

La evaluación de los niveles de mRNAs por RT-qPCR, mostró que los niveles de *Drosha* y *Adar-1S* presentaron un incremento significativo en los ratones expuestos a la Mezcla de PEs, con una tasa de cambio de 1,3 y 2 respectivamente, mientras que los niveles de acumulación de mRNAs para: *Dicer*, *Xpo5*, *Ago2*, *Snd1* y *Lin28b* fueron similares en los testículos de los ratones control y expuestos (**Figura 26**). Además, se observó que los niveles de mRNA para *Tut-4* tuvieron un incremento de dos veces en su tasa de cambio, sin embargo los niveles de mRNA para *Tut-7* no cambiaron estadísticamente (**Figura 27**).

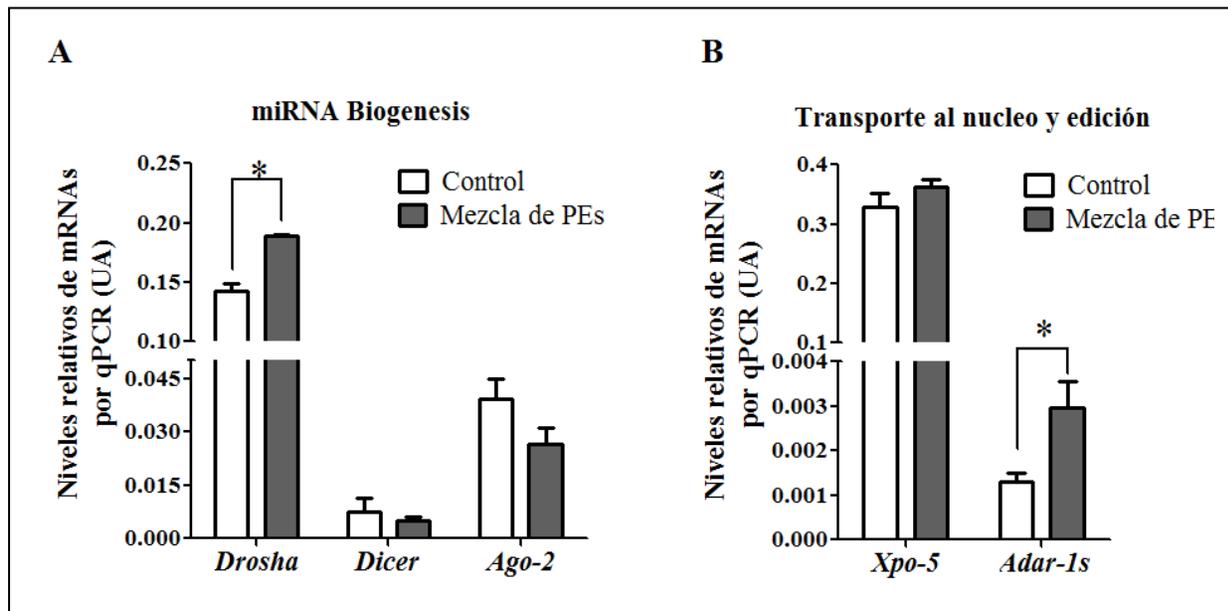


Figura 27.- La exposición a la Mezcla de PEs modifican los niveles de mensajero de elementos implicados en la biogénesis y edición de miRNAs.

Niveles de RNA mensajero relativos a la expresión de *Gapdh*, *H2afz* y *Ppia*, en testículos de ratones adultos de los animales expuestos a la Mezcla de PEs comparados con animales del grupo control. Cada barra es el promedio \pm E.S, $n > 3$, T-test Mann-Whitney, $*p < 0,05$.

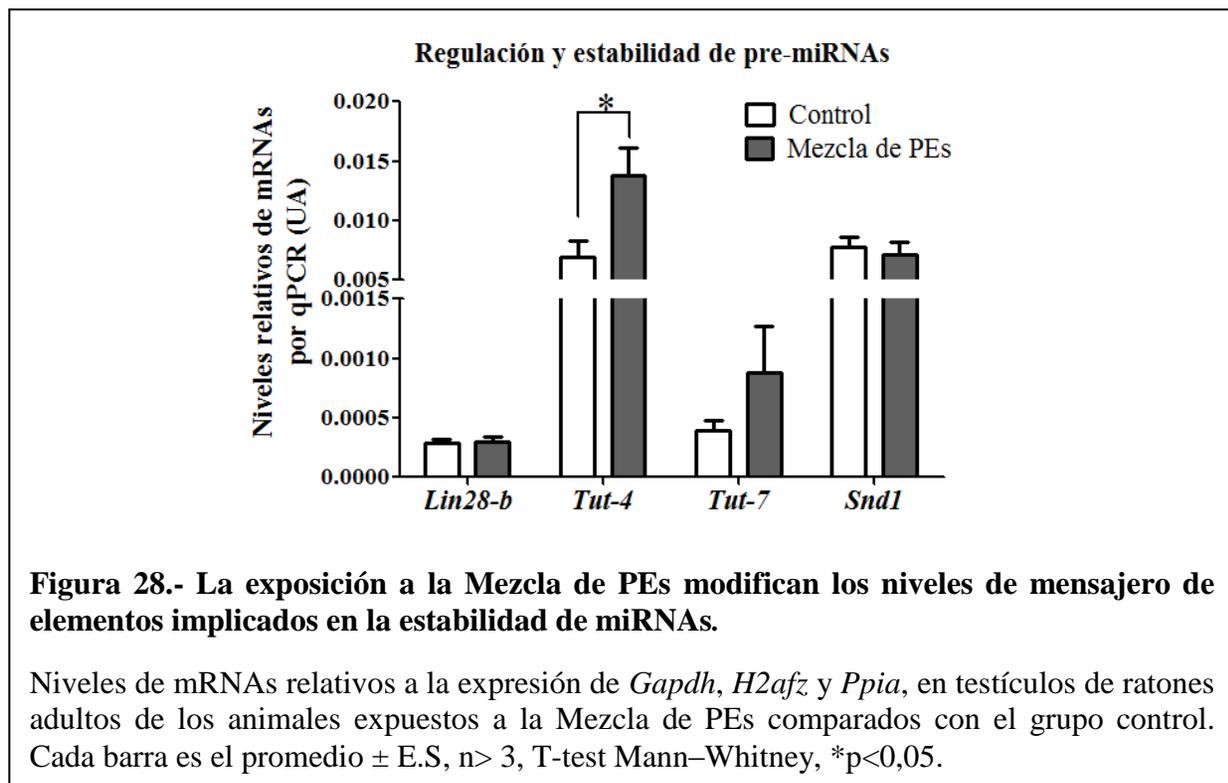


Figura 28.- La exposición a la Mezcla de PEs modifican los niveles de mensajero de elementos implicados en la estabilidad de miRNAs.

Niveles de mRNAs relativos a la expresión de *Gapdh*, *H2afz* y *Ppia*, en testículos de ratones adultos de los animales expuestos a la Mezcla de PEs comparados con el grupo control. Cada barra es el promedio \pm E.S, $n > 3$, T-test Mann-Whitney, $*p < 0,05$.

Estos datos sugieren que en los testículos de los animales expuestos a la Mezcla de PEs, aumentan los niveles de transcritos implicados en el mecanismo de biogénesis, edición y estabilidad de precursores de miRNAs. Lo cual, indicaría que la expresión de las formas maduras de miRNAs podría verse afectada. Al mismo tiempo, reafirman nuestra hipótesis de que los miRNAs estarían asociados con la inducción de los fenotipos observados luego de la exposición a la Mezcla de PEs. Sin embargo, nos surgieron las siguientes interrogantes: ¿cuantos y cuales miRNAs podrían alterar su expresión? y ¿también se verían afectadas variantes de secuencia de miRNAs o isomiRs?

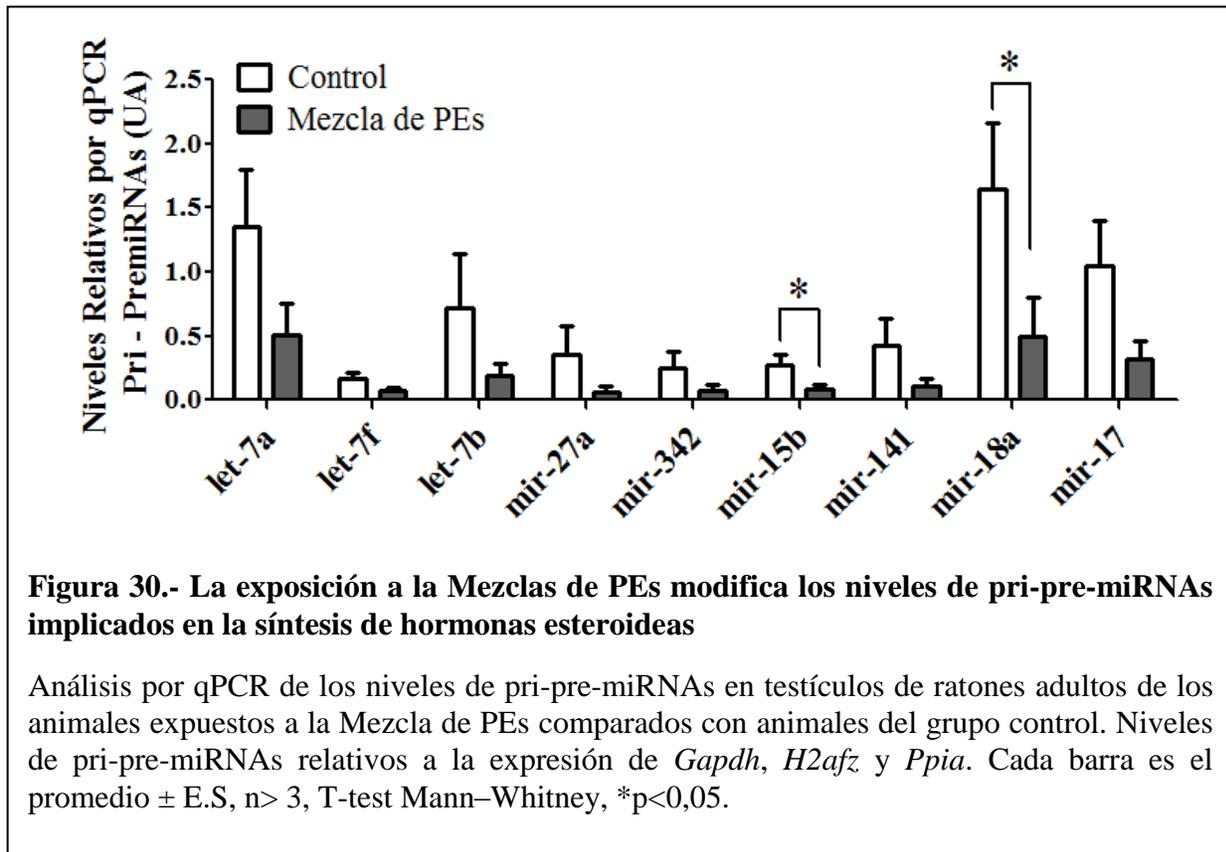
Para intentar dilucidarlas, abordamos el objetivo siguiente.

4. Determinar si la expresión de miRNAs se ve alterada por la exposición crónica a la mezcla de ftalatos y alquifenoles.

Los datos presentados hasta ahora han señalado una asociación entre la exposición crónica a mezclas de ftalatos y alquifenoles en ratones, con alteraciones en el testículo (disminución de niveles de estradiol y apoptosis de células germinales) y un incremento en los transcritos de elementos implicados en los mecanismos de biogénesis y regulación de miRNAs.

Inicialmente se seleccionaron un grupo de miRNAs que en un análisis bio-informático previo, resultaron ser potenciales candidatos para regular transcritos implicados en la síntesis de testosterona y estradiol en el testículo de ratones (**Anexo I-Figura 29**), y evaluamos los niveles de sus formas precursoras por RT-qPCR en los testículos de los ratones expuestos a la Mezcla de PEs comparándolos con el grupo control. Los datos mostraron que de los 9 pri-pre-miRNAs evaluados, 2 de ellos (*pri-pre-miR-15b* y *pri-pre-miR-18a*) disminuyeron significativamente su expresión, mientras que los 7 restantes no modificaban significativamente sus niveles (**Figura 30**).

Estos resultados se correlacionan con el aumento de *Adar-1S* y *Tut-4*, que son reguladores de las formas precursoras de miRNAs y podrían estar implicados en la disminución de los pri-pre-miRNAs señalados. Además, reafirma la idea que pueden existir miRNAs maduros diferencialmente expresados principalmente *miR-15b* y *miR-18a*.



Luego de la evidencia señalada y dada la imposibilidad de predecir con exactitud cual o cuales de los cientos de miRNAs estarían alterados, en este trabajo de tesis doctoral se evaluó la expresión global de todos los miRNAs “*miRNoma*”, en los testículos de ratones expuestos a la Mezcla de PEs comparándola con los animales control. Para ello, se realizó un análisis del perfil del *miRNoma* en los testículos de los ratones adultos (60 días), mediante metodología de secuenciación masiva de RNAs no codificantes de pequeño tamaño (sncRNA-Seq).

De este modo, una vez diseñadas y secuenciadas las genotecas, se realizó un alineamiento masivo de las secuencias obtenidas, contra el genoma de ratón. Únicamente, el total de secuencias que alinearon completamente contra el genoma de ratón en cada una de nuestras librerías (100%) fueron usadas para los siguientes mapeos. Se analizaron en total 9.583.296 y

7.937.120 de secuencias de sncRNAs procedentes de las genotecas denominadas control y Mezclas de PEs respectivamente. A continuación, se clasificaron las secuencias de los principales RNAs no codificantes de pequeño tamaño (miRNAs, piRNAs y endo-siRNAs). Los datos mostraron que ambas librerías de secuenciación estaban constituidas por: formas precursoras de miRNAs (aprox. 6%), miRNAs canónicos (aprox. 6%) y variantes de miRNAs o isomiRs (aprox. 4%) (**Tabla 11**). El resto de secuencias corresponden a secuencias de piRNAs, endo-siRNAs, tRNAs y otros sncRNAs (datos no mostrados). Los próximos análisis solo se basarán en los perfiles de miRNAs anotados en las base de datos mirBase en su versión 21 (miRNAs canónicos) y la bases de datos IsomiRage (variantes de miRNAs conocidos como isomiRs).

Tabla 11.- Análisis global de todas las poblaciones de miRNAs (precursores, canónicos e isomiRs) detectadas. Lecturas normalizadas por DESeq.

Identificador	Genotecas de sncRNA-Seq	
	Control	Mezcla de PEs
Total de secuencias	9.583.296	7.937.120
Total de secuencias mapeadas contra el genoma del ratón (mm10/GRCm38)	9.019.226 (100,00%)	7.735.608 (100,00%)
Total de secuencias de pre-miRNAs	536.943 (5,95%)	490.301 (6,30%)
Total de secuencias de miRNAs canónicos	553.180 (6,13%)	504.134 (6,52%)
Total de secuencias de isomiRs	355.786 (4,23%)	312.990 (3,82%)

En la base de datos de miRNAs (mirBase versión 21), se han reportado 1193 formas de pre-miRNAs y 1915 miRNAs maduros en el ratón (GRCm38). En este trabajo se detectó en ambas genotecas de secuenciación de testículo de ratón cerca de 540 y 770 tipos diferentes de pre-miRNAs y miRNAs maduros respectivamente. El menor número de pre-miRNAs y miRNAs

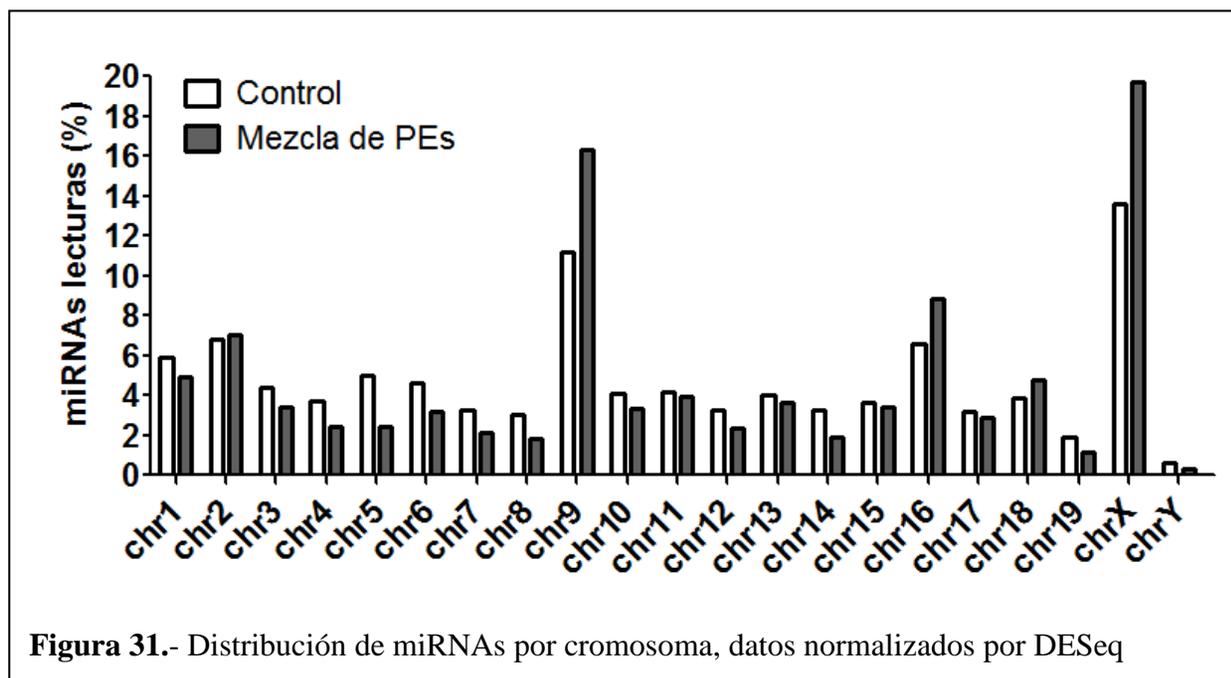
maduros, detectados en relación al número de miRNAs reportados para el ratón, se explica porque evaluamos los miRNAs de un órgano específico (testículo) y en una etapa de desarrollo específica (60 días de edad).

En lo que respecta a las variantes de miRNAs (isomiRs), se encontraron cerca de 3500 tipos diferentes de isomiRs en las genotecas de secuenciación. Este, a su vez es el primer reporte de variantes de miRNAs en testículo de ratón adulto expuestos a una mezcla de PEs.

A continuación estudiamos la localización en el genoma de las secuencias de miRNAs en base a su distribución por cromosoma. En general el perfil de distribución de secuencias de miRNAs por cromosoma es muy parecido, dado que ambas genotecas corresponden a testículos de ratón adulto (**Figura 31**). Sin embargo, fue muy interesante observar que en la genoteca perteneciente a ratones expuestos a la Mezcla de PEs hay un importante incremento en el número de secuencias de miRNAs que se localizan en los cromosomas 9, 16 y X. Al mismo tiempo es en estos cromosomas donde se observó un mayor porcentaje de secuencias de miRNAs, lo que podría sugerir que en estos cromosomas se localizan la mayor cantidad de miRNAs desregulados por la Mezcla de PEs usada en este trabajo.

De igual forma, se observó una tendencia generalizada de disminución de secuencias de miRNAs en casi todos los cromosomas. Esto es más evidente en los cromosomas 4, 5, 14, 19 e Y (**Figura 31**). Lo cual podría sugerir que existen miRNAs específicos o clúster de miRNAs dentro de esos cromosomas que disminuyen de forma considerable su expresión.

Una vez clasificadas las secuencias de miRNAs se procedió a comparar los valores de expresión (número de veces en que un mismo tipo de miRNA detectado está repetido) de los pre-miRNAs, miRNAs canónicos e isomiRs, y realizar un análisis de expresión diferencial tal y como se detalla en la sección correspondiente de materiales y métodos.



Al representarse el perfil de expresión de todos los miRNAs, a través de un mapa de calor y anexando un agrupamiento en jerarquías, según su perfil de expresión no se observaron grandes diferencias en el *miRNoma*, tan solo en algunos miRNAs selectos (**Anexo I, Figura 31**). En referencia a esto, los resultados finales del análisis de expresión diferencial mostraron que la exposición crónica a la Mezcla de PEs altera solo un muy reducido porcentaje de miRNAs maduros en el testículo de ratón, equivalente a 1,31% (**Tabla 12**).

Tabla 12.- Análisis global de todas las poblaciones de pre-miRNAs, miRNAs canónicos e isomiRs diferencialmente expresados. Lecturas normalizadas por DESeq.

Identificador	miRNAs detectados		miRNAs expresados diferencialmente
	Control	Mezcla de PEs	Mezcla de PEs
Precusores de miRNA	540	534	5 (0,94 %)
miRNAs canónicos	772	761	10 (1,31 %)
isomiRs	3552	3434	36 (1,05 %)

Esta interesante evidencia indica que pequeños cambios en el *miRNoma*, inducidos por la exposición a la mezcla de los perturbadores podrían provocar importantes alteraciones en el fenotipo del testículo de ratón.

En lo que respecta a los 5 pre-miRNAs con cambios, observamos que los niveles del *pre-miR-34b* estaban aumentados, mientras que los niveles de expresión de los precursores para, *miR-378*, *miR-1291*, *miR-1981* y *miR-15b* se encontraban disminuidos (**Anexo I-Tabla 15**). Cabe señalar que anteriormente habíamos observado por RT-qPCR que los niveles de *pre-miR-15b* disminuían (**Figura 29**), lo cual corrobora en parte los datos de secuenciación.

En lo que respecta a los miRNAs más abundantes, tal cual se refleja en el análisis de distribución por cromosoma, en ambas genotecas (control y de ratones expuestos) los 20 miRNAs mas abundantes abarcan el 55% y 57% del total de secuencias respectivamente, indicando que estos miRNAs podrían tener las funciones más importantes en la fisiología del testículo. Sin embargo, entre ellos únicamente el *miR-34b-5p* presentó un incremento tanto a nivel de su precursor como de su forma canónica, mientras que los otros 19 miRNAs mas abundantes no se alteraron (**Tabla 13**).

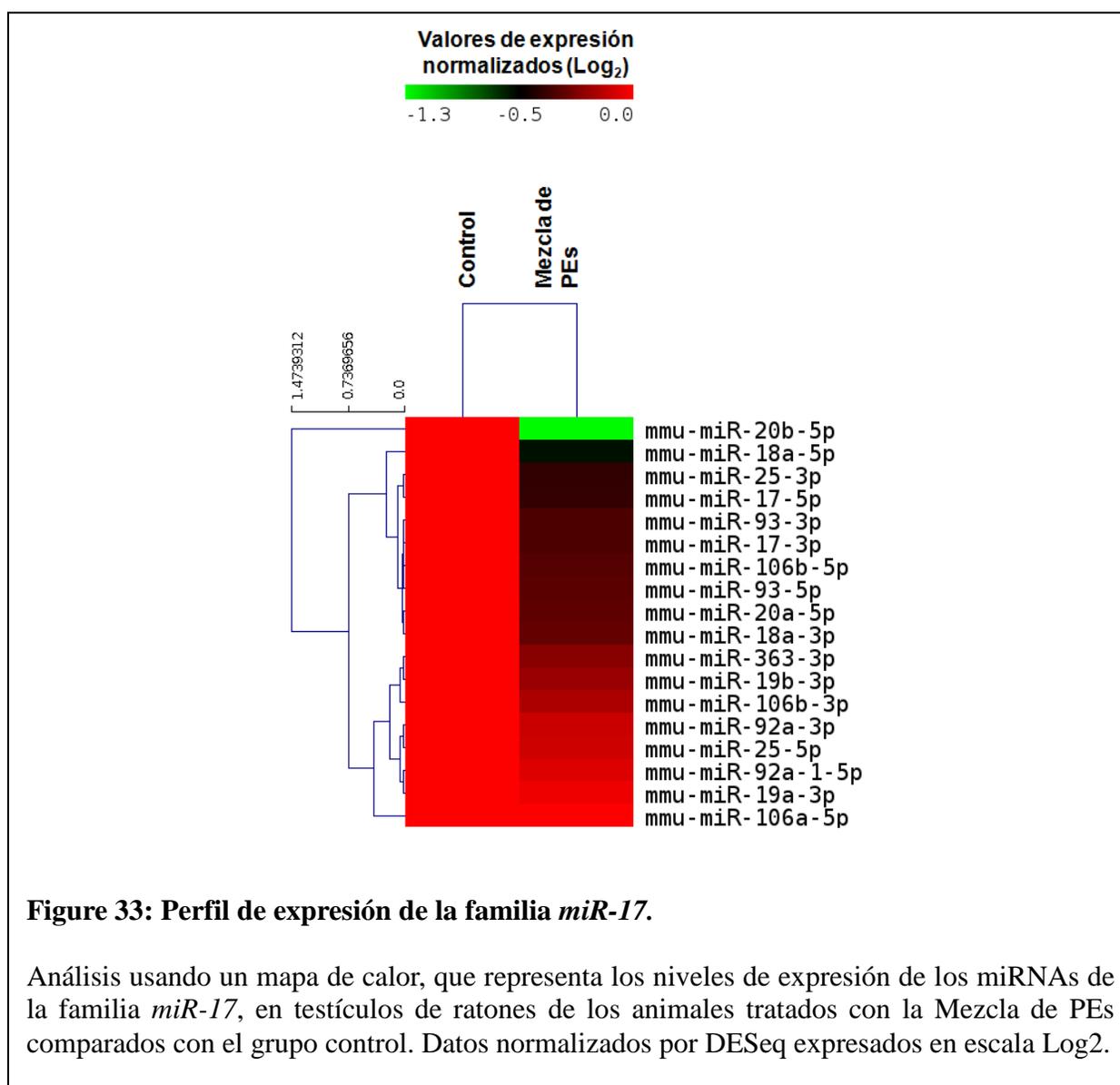
Tabla 13.- 20 miRNAs mas abundantes en ambas genotecas de secuenciación.

Únicamente se observa un aumento en la expresión de *miR-34b-5p* (resaltado en rojo). Datos normalizados por DESeq y expresados en escala Log₂, p<0,05, ns= no significativo.

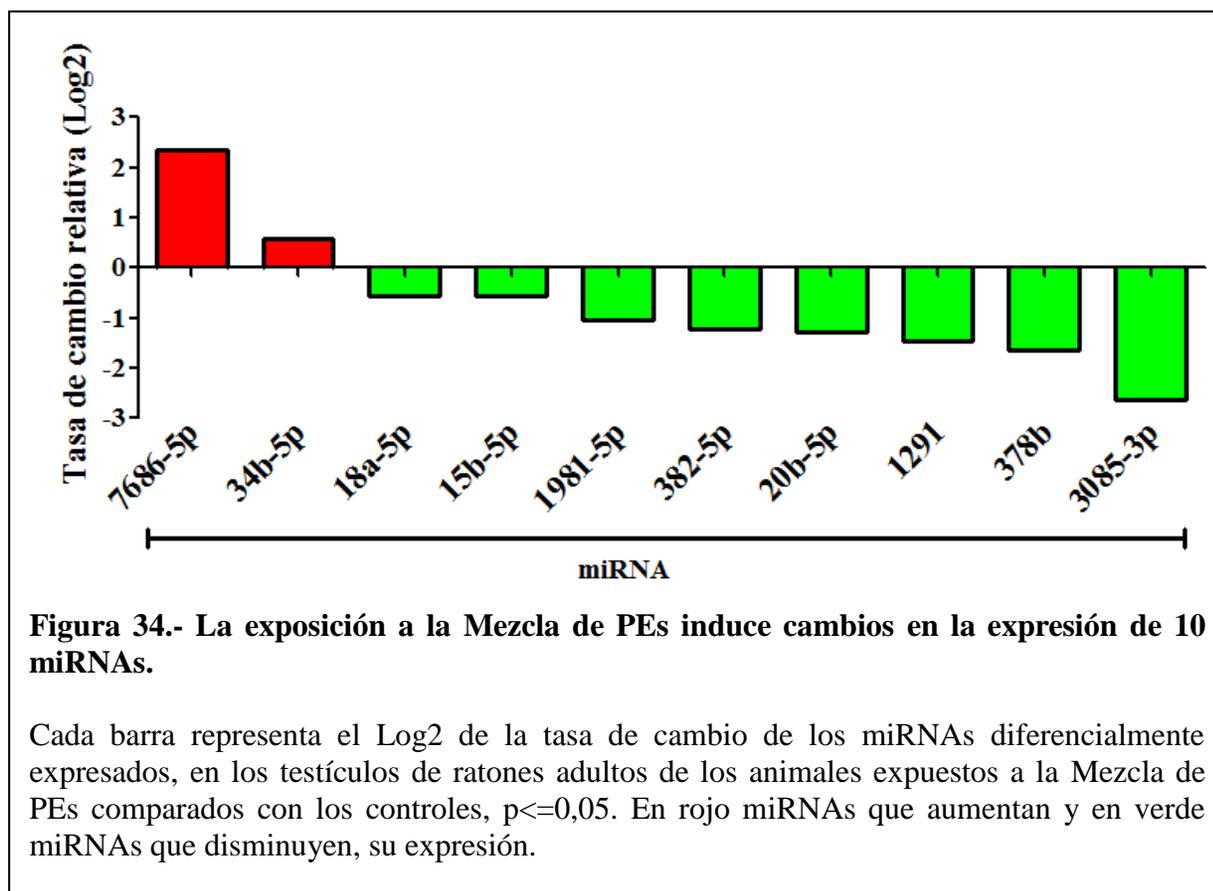
Orden	miRNA maduro	No. de moléculas secuenciadas		% de total de moléculas secuenciadas		Tasa de cambio (Log ₂)	valor-p
		Control	Mezcla de PEs	Control	Mezcla de PEs		
1	<i>miR-34c-5p</i>	42913	40632	8,33	7,60	- 0,08	ns
2	<i>miR-143-3p</i>	32286	35294	6,26	6,60	0,13	ns
3	<i>miR-881-3p</i>	25693	25038	4,99	4,68	- 0,04	ns
4	<i>miR-99a-5p</i>	16718	16848	3,24	3,15	0,01	ns
5	<i>let-7g-5p</i>	14036	15760	2,72	2,95	0,17	ns
6	<i>miR-191-5p</i>	13959	13500	2,71	2,53	- 0,05	ns
7	<i>miR-148a-3p</i>	13901	18238	2,70	3,41	0,39	ns
8	<i>miR-741-3p</i>	12630	11915	2,45	2,23	- 0,08	ns
9	<i>miR-470-5p</i>	11566	12612	2,24	2,36	0,12	ns
10	<i>miR-30a-5p</i>	11026	13302	2,14	2,49	0,27	ns
11	<i>miR-30d-5p</i>	10531	12746	2,04	2,38	0,28	ns
12	<i>miR-34b-5p</i>	10497	15875	2,04	2,97	0,60	< 0.05
13	<i>miR-103-3p</i>	9709	8229	1,88	1,54	- 0,24	ns
14	<i>miR-871-3p</i>	9542	11533	1,85	2,16	0,27	ns
15	<i>miR-26a-5p</i>	9126	11166	1,77	2,09	0,29	ns
16	<i>let-7f-5p</i>	9062	11447	1,76	2,14	0,34	ns
17	<i>let-7c-5p</i>	8878	9668	1,72	1,81	0,12	ns
18	<i>miR-465c-5p</i>	8305	9901	1,61	1,85	0,25	ns
19	<i>miR-21a-5p</i>	7785	8096	1,51	1,51	0,06	ns
20	<i>miR-30c-5p</i>	7588	7042	1,47	1,32	- 0,11	ns

Como se mencionó en el apartado de introducción, algunos miRNAs son expresados como RNAs de tipo policistronicos agrupados en clusters. Una de las familias de miRNAs más importantes en el testículo y en otros tejidos, es la familia *miR-17*; que incluye al “clúster” *miR-17-92* y sus parálogos: los “clústers” *miR-106a~363* y *miR-106b-25* (Concepcion et al. 2012). En los testículos de ratones expuestos de forma crónica a la Mezcla de PEs,

comparándolos con los niveles de expresión de controles, se investigó en los datos de sncRNA-Seq, los niveles de expresión de todos los miRNAs que forman parte de la familia *miR-17*, solo pudimos observar que existen dos miRNAs pertenecientes a esta familia, que para este caso disminuyeron sus expresión (*miR-18a-5p* and *miR-20b-5p*), en tanto los otros miRNAs de la familia *miR-17*, no se alteraron (**Figura 33, Anexo I-Tabla 14**).

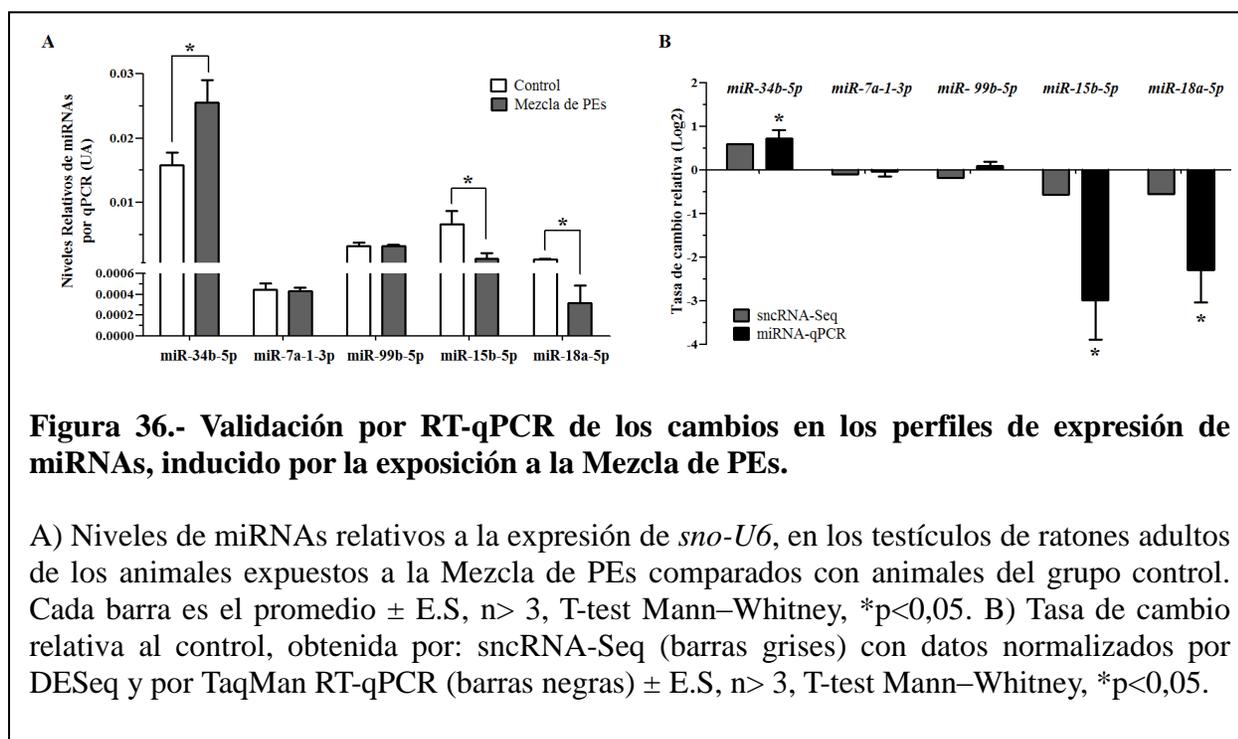


La expresión diferencial de miRNAs dentro de un mismo “clúster”, sugiere una participación del mecanismo de regulación del procesamiento de miRNAs, lo cual se discutirá más adelante. Finalmente, nuestro análisis de expresión diferencial pudo identificar los miRNAs alterados en los testículos de ratones adultos expuestos a la Mezcla de PEs (**Figura 34, Anexo I-Tabla 15**).



La localización por cromosoma de 8 miRNAs diferencialmente expresados, coincide con su perfil de distribución global en las genotecas de ratones expuestos a la Mezcla de PEs. Esto se refleja de forma más clara para *miR-34b-5p*, que aumenta su expresión (con locus en el cromosoma 9), y para los *miR-1981-5p*, *miR-15b-5p* y *miR-18a-5p* (con loci en los cromosomas 1-3-14 respectivamente) (**Figura 31, Anexo I-Figura 35**).

A continuación, procedimos a validar por RT-qPCR los perfiles de expresión de algunos de los miRNAs encontrados diferencialmente expresados por la sncRNA-Seq. Pudimos corroborar que los niveles de expresión para *miR-34b-5p* aumentaban significativamente su expresión, mientras que los niveles de expresión para *miR15b-5p* y *miR-18a-5p*, también disminuían significativamente. Los niveles de *let-7a-1-3p* y *miR-99b-5p* fueron usados como controles por no mostrar cambios en su expresión bajo la técnica de sncRNA-Seq e igualmente se mostraron sin variaciones significativas al ser medidos por RT-qPCR, Además el análisis de las tasas de cambio medidas por ambas técnicas mostraron reflejar la misma tendencia (**Figura 36A-B**).



Estos análisis validan nuestros resultados obtenidos por secuenciación. Además los datos de secuenciación han sido depositados en la plataforma de GEO (GSE84695) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE84695>), para la disponibilidad de cualquier investigador.

A continuación, analizamos los niveles de expresión de las variantes de secuencias de miRNAs. Los análisis mostraron que a pesar de haber detectado un número importante de isomiRs, solo un 1,05% (36) de ellos se vieron diferencialmente expresados: 4 incrementaron sus niveles y 32 isomiRs disminuyeron su expresión de manera estadísticamente significativa (**Figura 37**). Aunque el porcentaje de isomiRs que se encuentra diferencialmente expresado es pequeño en relación al número total de isomiRs es, al mismo tiempo, cerca de 4 veces más alto que el número de miRNAs diferencialmente expresados, lo que sugiere una función importante de los isomiRs en las alteraciones en el testículo observadas e inducidas por los perturbadores endocrinos.

Resulta muy interesante observar que existen múltiples y diversas variantes de isomiRs que están significativamente desreguladas al igual que sus miRNAs canónicos (*miR-18a-5p*, *miR-15b-5p*, *miR-1981-5p*, *miR-20b-5p*, *miR-3085-3p*) (**Figura 38A, Anexo I, Tabla 15**). Además, es importante señalar que el 80% de las secuencias de isomiRs diferencialmente expresadas son variantes de miRNAs producidas por mecanismos de adición de nucleótidos de adenina (A) y/o uracilo (U) en su extremo 3'. Mientras que, el otro 20% de las variantes de miRNAs diferencialmente expresadas son producidos por mecanismos de sustitución, también en el extremo 3' del miRNA canónico. Del mismo modo, no encontramos ninguna variante de isomiRs expresado diferencialmente, que tenga variaciones en el extremo 5' o en la región semilla de su miRNAs canónico (**Figura 38B**).

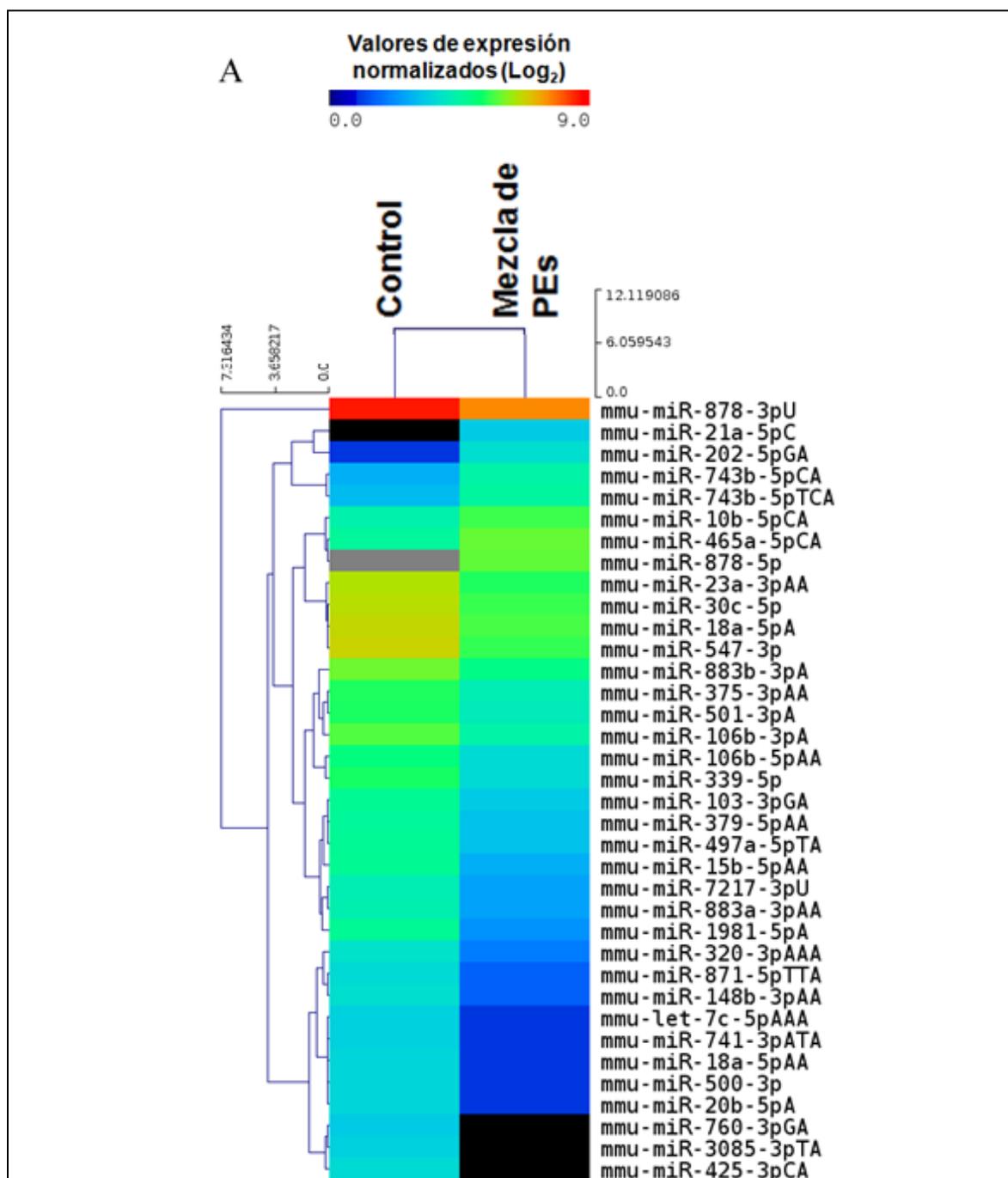
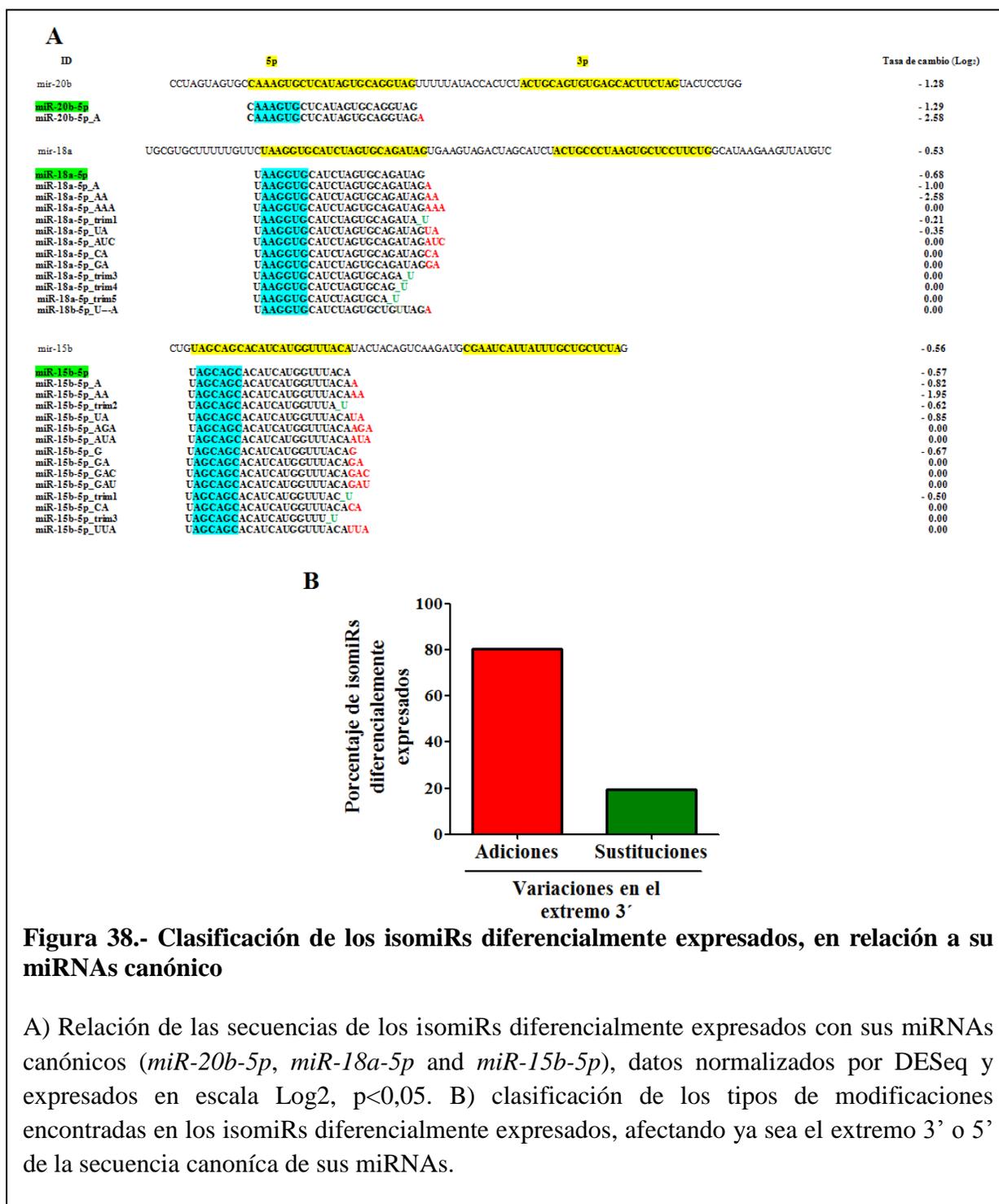


Figura 37.- IsomiRs diferencialmente expresados en testículos de ratones expuestos a Mezclas de PES.

Análisis usando un mapa de calor, que representa los niveles de expresión de los isomiRs agrupados, en testículos de ratones de los animales tratados con la Mezcla de



Este análisis nos señala que los isomiRs diferencialmente expresados por la exposición a la Mezcla de PEs son variantes que tienen la misma capacidad de unirse a los mRNAs dianas de

sus correspondientes miRNAs canónicos. Al compartir mRNAs dianas, estos isomiRs podrían actuar cooperativamente junto a los miRNAs y potenciar el silenciamiento de mRNAs, siendo al mismo tiempo desregulados por la exposición a la Mezcla de PEs.

Luego de conocer el número y tipo de miRNAs diferencialmente expresado por la exposición a nuestra Mezcla de PEs, es necesario asociar los cambios en su expresión con los niveles de sus mRNAs dianas. De esta forma, se puede correlacionar la pérdida o sobreexpresión de la actividad de los miRNAs con los procesos biológicos alterados, en especial en lo que respecta a la disminución de estradiol intratesticular y la apoptosis de células germinales.

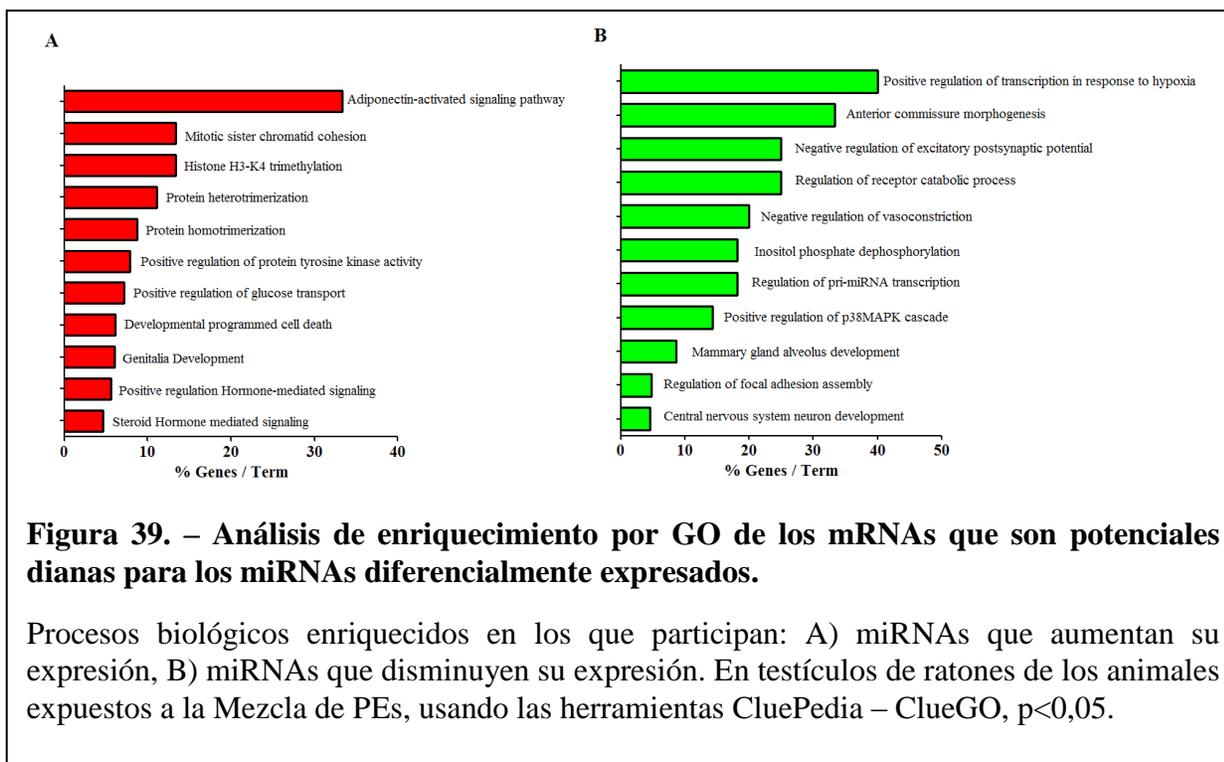
Por ello abordamos el objetivo 5.

5.- Determinar si los miRNAs diferencialmente expresados, participan en la disminución de estradiol y la apoptosis de células germinales, inducida por la exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles.

Un paso para determinar la participación de un miRNAs en un fenotipo, es determinar el proceso biológico alterado y verificar si existe una correlación negativa con los niveles de expresión de algunos de sus dianas que estén implicados en el proceso estudiado. Por ello, se procedió a identificar todos los posibles mRNAs dianas, usando la metodología que especificamos en la sección de métodos.

Los genes dianas probablemente afectados por los miRNAs alterados son principalmente factores de transcripción como *Foxj2*, *Nfat5*, *Sp1*, *Stat3*, *Ppar γ* , *Hsf2*, Proteínas de unión a poli(A) como *Strbp*, represores y activadores transcripcionales como *Phc3*, y *Mllt3*, metiltransferasas como *Dnmt3a*, *Dnmt3b* entre otros. Estos genes están involucrados en la morfogénesis en varios tejidos, como reguladores del proceso de transcripción, en la proliferación de células germinales, en los cambios a nivel epigenéticos y en la producción de hormonas esteroideas, sucesos claves para el desarrollo del testículo y la mantención de la espermatogénesis.

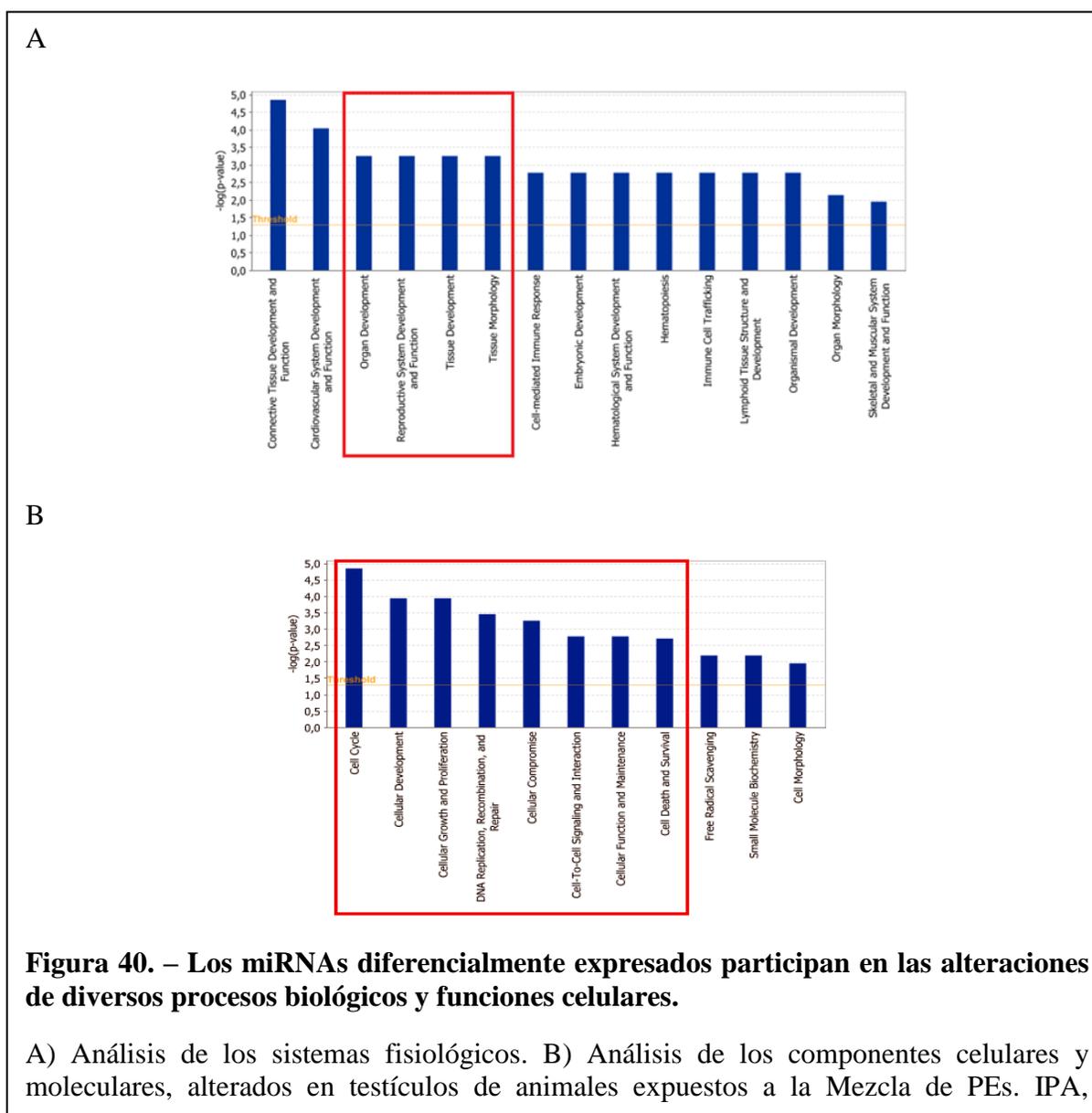
Con esta lista de genes, y haciendo uso de las herramientas de ontología génica (GO), determinamos los procesos biológicos y las funciones moleculares que se encuentran enriquecidas (alteradas). Los datos señalan que muchos de los términos de GO que se encontrarían alterados, están implicados en el desarrollo de los testículos y en el mantenimiento de la espermatogénesis, tales como: señalización hormonal, desarrollo de los genitales, proliferación y muerte celular, procesos metabólicos, plegamiento de proteínas, metilación de histonas, regulación de quinasas y fosfatasa, entre otras (**Figura 39**).



Para profundizar en los procesos en que participan los miRNAs desregulados, se realizó una segunda predicción *in silico*, utilizando la memoria de la plataforma de IPA “Ingenuity Pathway analysis”.

El análisis de los sistemas fisiológicos señala que se encuentran altamente enriquecidos los procesos implicados en el desarrollo de órganos y tejidos, específicamente el desarrollo y función de órganos reproductivos. En lo que respecta a los componentes celulares y moleculares, el análisis por IPA señala, en resumen, funciones ligadas a desarrollo, proliferación, señalización y muerte celular, las cuales estarían comprometidas (**Figura 40**).

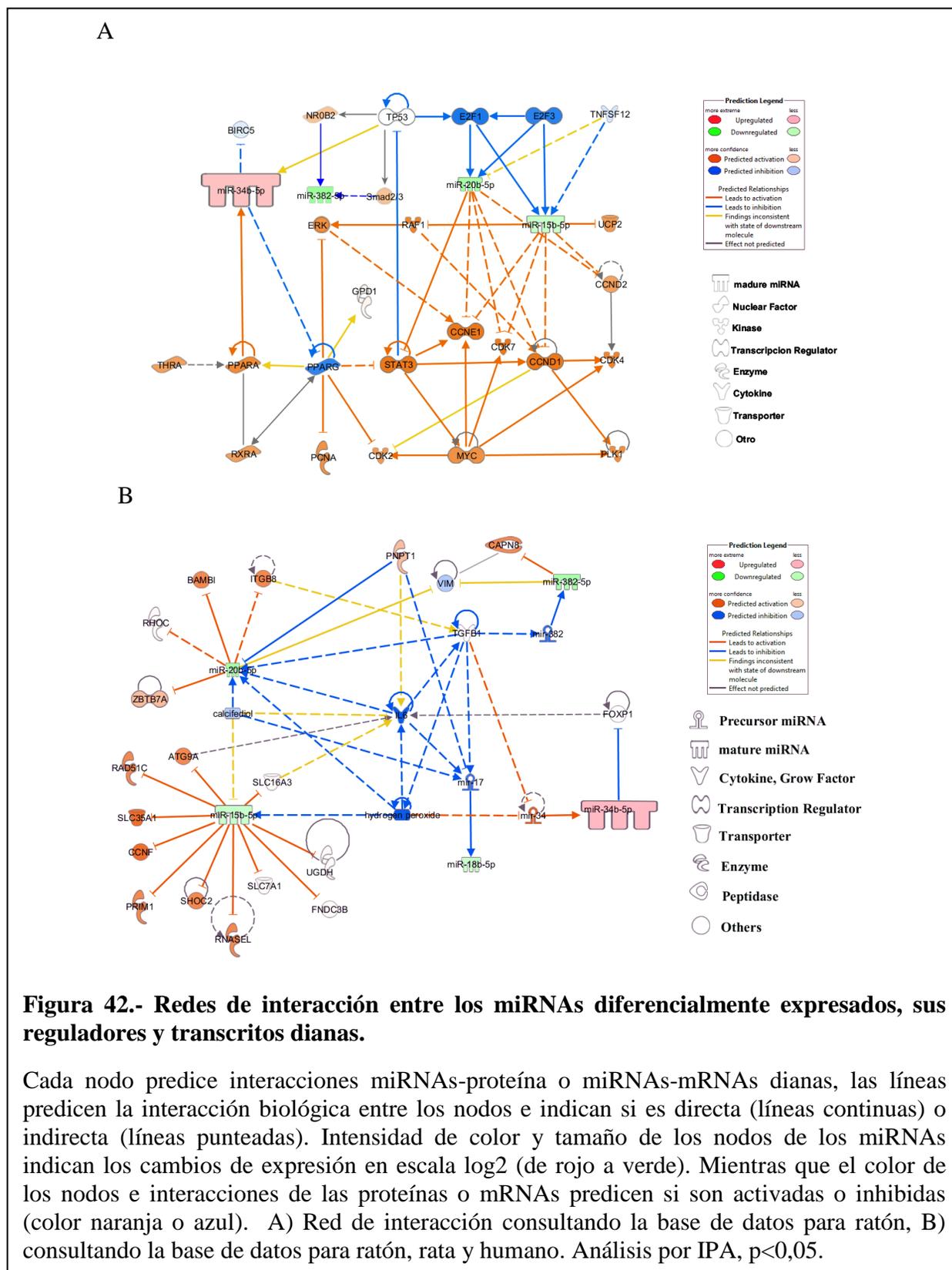
Finalmente, es interesante mostrar un tercer análisis de las herramientas de IPA que detalla, las potenciales patologías y desordenes en los que estarían involucrados los miRNAs alterados, siendo las de más relevancia para nuestro sistema: cáncer, daño y anormalidades de órganos, respuesta inflamatoria y desordenes del sistema endocrino (**Anexo I-Figura 41**)



Ambos análisis señalan procesos específicos en el testículo que estarían comprometidos vía cambios en los miRNAs antes reportados, que se relacionan con la disminución de estradiol y la apoptosis de células germinales observadas en los ratones expuestos a la Mezcla de PEs. Sin embargo, definir procesos biológicos alterados, mediados por cambios en los miRNAs que mostramos desregulados tiene relevancia relativa, si no podemos establecer algunas de las interacciones miRNAs/mRNAs que estarían gobernando estos procesos.

Empleando la herramienta de IPA fue muy interesante predecir que: reguladores transcripcionales (Eif1-Eif2, Eif3, p53, Myc), citoquinas (Tgf β 1, Il6, Tnfsf12, Igfr1) y factores de transcripción (Ppara, Nr0b2, Grhl3) estarían controlando la expresión de varios de los miRNAs que mencionamos como diferencialmente expresados (**Figura 42**).

Al mismo tiempo el diseño de redes usando la memoria de IPA, nos señala las interacciones más probables que podrían establecerse entre nuestros miRNAs diferencialmente expresados y sus transcritos dianas. También nos otorga mRNAs dianas de nueva predicción (que nosotros no habíamos considerado), cuya expresión estaría controlada por los miRNAs diferencialmente expresados. Estas interacciones señalan que en la mayoría de los casos, el aumento o activación de la expresión de estos transcritos (color naranja) estaría siendo facilitado por la disminución en la expresión de los miRNAs (color verde). Mientras que, en otros casos, el aumento en la expresión de miRNAs (color rosa) estaría promoviendo una inhibición de la acumulación de los transcritos señalados y/o su bloqueo a nivel traduccional (color azul). Los análisis de redes también señalan si las interacciones predichas son directas e indirectas (**Figura 42**).

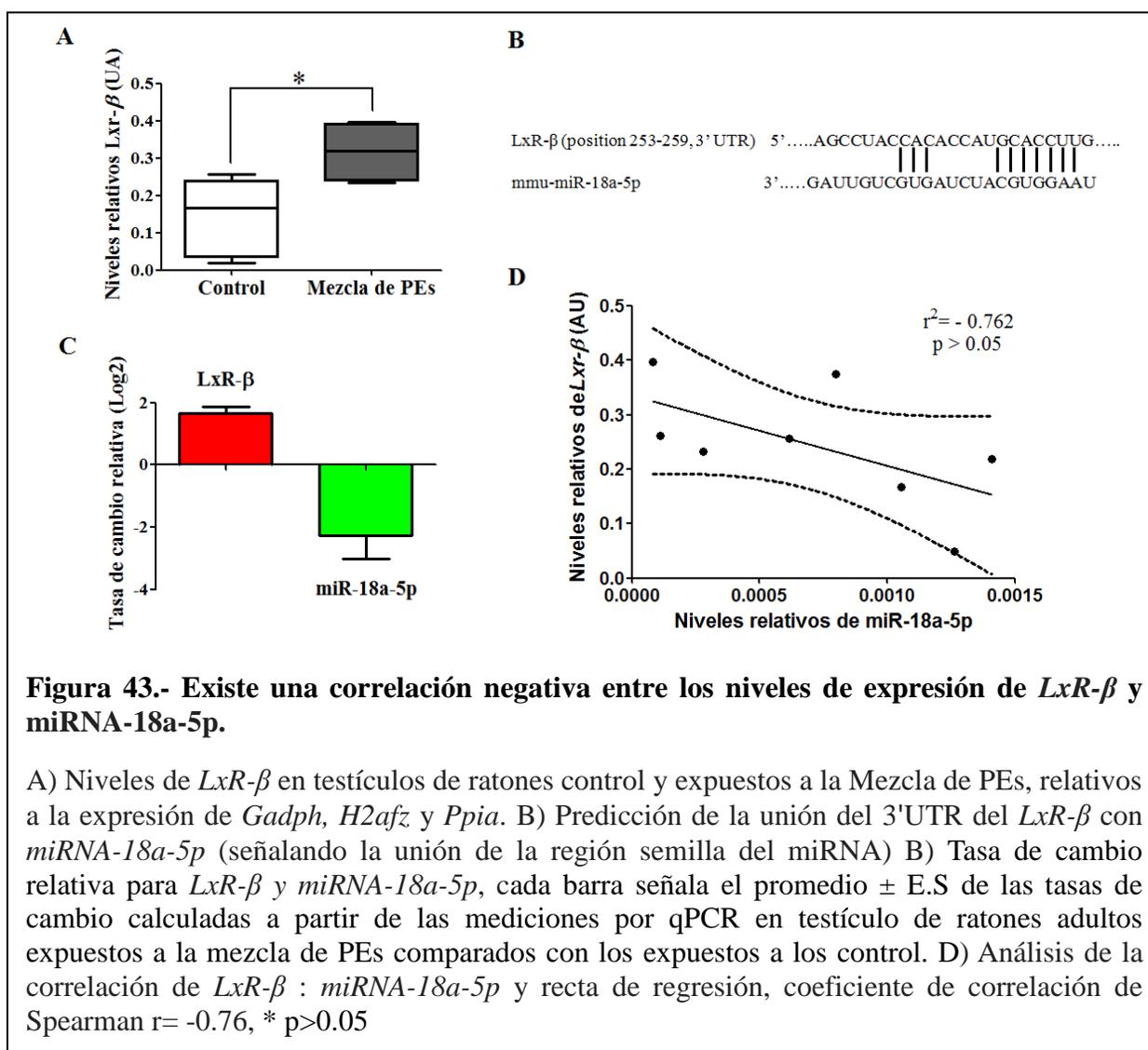


Estos análisis de interacciones nos señalan la importancia que tienen los miRNAs diferencialmente expresados, en el control de los procesos biológicos que encontramos desregulados. Los análisis de procesos biológicos alterados, así como el establecimiento de las interacciones miRNAs: mRNAs por análisis de redes, nos sugieren que la desregulación de los miRNAs estaría participando en la inducción de las alteraciones encontradas en los testículos de ratones expuestos a la Mezcla de PEs a través de sus potenciales mRNAs.

A continuación, se quiso establecer asociaciones entre los miRNAs diferencialmente expresados y los transcritos de la vía esteroidogénica diferencialmente expresados.

Después de revisar las interacciones que nos otorgo el análisis bioinformático (**Anexo I-Figura 28**) Entre otras, es destacable la interacción miRNA: mRNA diana, existente entre un regulador de la expresión de enzimas de la vía esteroidogénica (la isoforma beta del receptor hepático X (*LxR-β*)) y el *miR-18a-5p*.

Esta descrito en la literatura que, *LxR-β* es un receptor nuclear que regula de forma positiva la expresión de *Star* y *Cyp11a1*, además puede regular negativamente la expresión de *Cyp19a1* (He et al. 2010; Simpson et al. 2002). En nuestras predicciones, se esperó que los niveles de *LxR-β* debieran estar aumentados, posiblemente vía la ausencia del *miRNA-18a-5p* que debería regularlo. Después de validar la predicción, los datos mostraron que, los niveles de *LxR-β* estaban significativamente sobre-expresados en casi el doble, en los testículos de ratones expuestos a los tratamientos. A su vez el aumento de la expresión de *LxR-β* se correlacionaba negativamente con la disminución en la expresión de *miRNA-18a-5p* (**Figura 43**).



Este dato, sugiere que *miR-18a-5p* podría ser uno de los miRNAs que participa en la disminución de estradiol en testículos de ratones expuestos a los ftalatos, alquifenoles y a sus mezclas, a través de un circuito de regulación entre *miR-18a-5p* y *LxR-β*, que se vería alterado. De esta forma, la activación de *LxR-β* o *LxR-α*, vía pérdida de *miR-18a-5p*, podría ser uno de los mecanismos relacionados con los cambios de expresión de *Star*, *Cyp17a1*, y *Cyp19a1*; que se sugiere estarían asociados con la disminución de estradiol y el fenotipo observado en el testículo de los animales expuestos a los PEs.

A continuación, para definir la participación de los miRNAs en la apoptosis de células germinales inducida por la exposición a la Mezcla de PEs, realizamos previamente una aproximación global a las alteraciones en el proteoma del testículo de ratón, para determinar de forma directa las proteínas que estarían involucradas en muerte celular, y luego buscar si existen asociaciones con los miRNAs diferencialmente expresados.

Usando como metodología separaciones electroforéticas en geles bidimensionales, pudimos comparar los cambios a nivel del proteoma del testículo de ratón en los animales expuestos a la Mezcla de PEs frente a los controles. Posteriormente, mediante el análisis de los spot, que cambian estadísticamente su expresión, pudimos revelar que la exposición a la Mezcla de PEs cambia los niveles proteicos de 18 proteínas distintas (10 proteínas aumentaban y 8 disminuían su expresión). Finalmente, por la identificación de la huella peptídica de dichos spots por espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF), pudimos identificar dichas proteínas. De esta forma nuestros análisis muestran que en el testículo de ratones expuestos a la Mezcla de PEs se induce un aumento en los niveles proteicos de: Diablo, Hint1, Eif4e, Psmb4, Cndp2, Nme2, Mp1, Pgam1, Ivd y 2700060E02Rik. Y una disminución en los niveles proteicos de: Vdac2, Pgp, Hspa8, Fkbp4, Pdia3, Gstm2, Gstm7 y Cct2 (**Tabla 16, Anexo I-Figura 44-45**).

Tabla 16.- Cambios en el proteoma de testículos de ratones expuestos a la mezcla de perturbadores endocrinos.

No. ¹	Codigo ²	Símbolo	Proteína	MM (Da) /pI teórico ³⁻⁴ .	Mat'db peps ⁵ .	Función molecular ₆	Proceso biológico ⁶
A. Proteínas sobreexpresadas en testículos de ratones expuestos a la mezcla de PEs							
203	Q9JIQ3	Diablo	Diablo homolog, mitochondrial	26975 / 6,3	7	Inhibidor de la actividad de caspasas (IAP)	Vía intrínseca de la apoptosis
5101	P70349	Hint1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	13882 / 6,36	5	Actividad hidrolasa	Vía intrínseca de la apoptosis, regulación positiva de la señalización mediada por calcio.
4301	P63073	Eif4e	Eukaryotic translation initiation factor 4E	25266 / 5,79	4	Factor de iniciación de la transcripción (4G) en eucariotas	Regulación de la transducción, regulador positivo del ciclo celular, respuesta al miedo
3202	P99026	Psmb4	Proteasome subunit beta type-4	29211 / 5,47	7	Actividad treonina endopeptidasa	Catabolismo de proteínas ubiquitinadas mediado por el proteosoma
3702	Q9D1A2	Cndp2	Cytosolic non-specific dipeptidase	53190 / 5,43	6	Actividad dipeptidasa	Proteolisis
7101	Q01768	Nme2	Nucleoside diphosphate kinase B	17466 / 6,97	9	Actividad difosfato quinasa, unión a ácidos grasos	Mitofagia en respuesta a la depolarización de la mitocondria, respuesta celular a ácidos grasos, al estímulo de glucosas y estrés oxidativo
3601	Q924M7	Mpi	Mannose-6-	47229 /	7	Actividad manosa-	Glicolisis

			phosphate isomerase	5,62		6-fosfato isomerasa	
6401	Q9DBJ1	Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	28928 / 6,67	7	Actividad fosfoglicerato mutasa. Unión a proteínas quinasa	Glicolisis
5605	Q9JHI5	Ivd	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	46695 / 8,53	5	Actividad isovaleril-CoA deshidrogenasa. Unión a lípidos	Homeostasis lipidica
6303	Q9CQE8	2700060E0 2Rik	UPF0568 protein C14orf166 homolog	28249 / 6,4	5	Proteína de unión a RNA Poli(A)	Regulador positivo de la transcripción, tRNA splicing,

B. Proteínas disminuidas en su expresión en testículos de ratones expuestos a la mezcla de PEs

1502	Q8CHP8	Pgp	phosphoglycolate phosphatase	34975 / 5,21	10	Unión a magnesio, actividad fosfoglicerato fosfatasas	Metabolismo de carbohidratos, desfosforilación
2901	P63017	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	71055 / 5,37	8	Actividad ATPase, proteína de unión a RNA, poli(A), plegamiento de proteínas	Metabolismo, chaperona que media el plegamiento de proteínas
3804	P30416	Fkbp4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	51939 / 5,54	14	Unión a ATP, unión al receptor de glucocorticoides, proteína de unión a RNA poli(A).	Señalización por receptor de andrógenos, implantación embrionaria, diferenciación sexual en machos, desarrollo de estructuras reproductivas
3807	P27773	Pdia3	Protein disulfide-	57099 / 5,88	14	Proteína de unión a RNA Poli(A),	Homeostasis redox, regulador positivo de la apoptosis por vía

			isomerase A3			actividad disulfide isomerasa	extrínseca, plegamiento de proteínas
6302	P15626	Gstm2	Glutathione S-transferase Mu 2	25871 /6,9	12	Actividad glutatión transferasa	Metabolismo de xenobióticos
5308	Q80W21	Gstm7	Glutathione S-transferase Mu 7	25864 / 6,34	4	Actividad glutatión transferasa	Metabolismo de xenobióticos
5705	P80314	Cct2	T-complex protein subunit beta 1	57783 / 5,97	12	Unión a proteínas ubiquitinas ligasas	Unión del espermatozoide a la zona pelucida, chaperona que media el ensamble de proteínas, transporte de toxinas
7401	Q60930	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	32340 / 7,44	6	Actividad canal de voltaje anionico	Regulador negativo de la vía intrínseca de la apoptosis, esteroidogénesis

Los datos representados corresponden a las proteínas candidatos de mayor significación estadística codificadas en la base de datos MGI (*mouse genome informatic*) para ratón.

¹ Numero de Spot, mostrados en geles 2D (figura 5)

² Código de acceso a la proteína; base de datos para ratón (MGI)

³ Peso molecular teórico (Da), ⁴ Punto isoeléctrico teórico (pI)

⁵ Numero de péptidos coincidentes

⁶ Clasificación ontológica, de acuerdo a las bases de datos MGI e UniprotKB

Es interesante mostrar que, analizando en detalle las características funcionales y la evidencia en la literatura de estas proteínas alteradas, podemos señalar que exceptuando a 2700060E02Rik (por no estar del todo caracterizada) ya sea directa o indirectamente todas las proteínas que cambian su expresión participan en los procesos de apoptosis de células germinales (señalado en el apartado de discusión de esta tesis).

Además, nuestras predicciones bio-informáticas revelaron que los cambios en la expresión de al menos 12 de estas proteínas, se podrían asociar a algunos de los miRNAs diferencialmente expresados, al ser los transcritos de estas proteínas sus dianas. E incluso, algunos de los transcritos de estas proteínas son dianas de más de un miRNA diferencialmente expresado, lo que hace más probable su regulación post-transcripcional por parte de estos miRNAs.

De este modo, la correlación inversa (al menos de forma cualitativa) que se puede establecer entre los perfiles de expresión de miRNAs y proteínas implicadas en apoptosis (**Tabla 17**), nos acercan a una explicación más plausible del complejo mecanismo por el cual, la exposición a la Mezcla de PEs estaría participando en el aumento de la apoptosis de células germinales vía cambios en la expresión de miRNAs.

En resumen, con todos los datos aportados *in silico*, junto con los niveles de expresión determinados para algunos transcritos y proteínas experimentalmente nos permiten sugerir que principalmente *miR-34b-5p*, *miR-7686-3p*, *miR-18a-5p*, *miR-15b-5p*, *miR-20b-5p*, *miR-382-5p*, *miR-378b*, *miR-3085-3p* y *miR-1981-5p* estarían relacionados con la disminución intratesticular de estradiol y con la apoptosis de células germinales inducidas por la exposición crónica a una mezcla definida de flalatos y alquilfenoles (**Tabla 17**).

Tabla 17.- Asociación entre proteínas o transcritos dianas y los miRNAs diferencialmente expresados en los testículos de ratones expuestos a la mezcla de PEs.

Las predicciones fueron hechas usando la memoria de IPA y las bases de datos de mirWalk. El estatus patológico en el testículo fue hecho en base a referencias en la literatura. Rojo = expresión aumentada, verde = expresión disminuida.

miRNA expresión	Diana asociada (expresión confirmada)	Función	Fenotipo involucrado	Metodología aplicada para confirmar la expresión de la diana asociada
miR34b-5p	Gstm2	Enzima	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR34b-5p	Gstm7	Enzima	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-7686-5p	Pdia 3	Chaperona	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-7686-5p	Fkbp4	Chaperona	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-7686-5p	Cct2	Chaperona	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-34b-5p, miR-7686-5p	Sp1	Factor de transcripción	disminución de estradiol	qPCR
miR-18a-5p	LxR- β	Factor de transcripción	disminución de estradiol	qPCR
miR-18a-5p, miR-20b-5p, miR-15b-5p, miR-1981-5p, miR-382-5p	StAR	Factor de transcripción	disminución de estradiol	qPCR

miR-20b-5p, miR-382-5p, miR 3085-3p, miR-18a-5p, miR-1981-5p	Diablo	proteína pro- apoptotico	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-1291	Hint 1	Enzima	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-15b-5p, miR-20b-5p, miR-378b, miR- 1981-5p, miR18a-5p, miR-382-5p	Eif4e	Iniciador de la transducción	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-15b-5p, miR-20b-5p	Psm4	Sub-unidad del proteosoma	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-15b-5p, miR-378b, miR- 3085-3p, miR- 1981-3p, miR- 382-5p	Pgam1	Enzima	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-15b-5p, miR-378b, miR- 3085-3p, miR- 1981-3p, miR- 382-5p	Ivd	Enzima	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica
miR-15b-5p, miR-378b, miR- 3085-3p	Cndp2	Enzima	Apoptosis de células germinales	Electroforesis 2D - Identificación de la huella peptídica

miRNA expresión	blanco asociado (expresión predicha)	Función	Fenotipo involucrado	Referencia
miR34b-5p	Birc5	Proteína anti-apoptótica	Apoptosis de células germinales	(Y. Wang et al. 2004)
miR34b-5p	Axl	Receptor tirosina quinasa	Apoptosis de células germinales	(Hasanbasic et al. 2004; Chan et al. 2011)
miR34b-5p	Yy1	Factor de Transcripción	Apoptosis de células germinales	(Wu et al. 2009)
miR34b-5p	Bcl-2	Proteína anti-apoptótica	Apoptosis de células germinales	(Codelia et al. 2010; Ortiz et al. 2009)
miR34b-5p	Ppar γ	Receptor Nuclear	disminución de estradiol	(Kowalewski et al. 2009; Kobayashi et al. 2003)
miR-34b-5p, miR-7686-5p	Lgr4	Receptor acoplado a proteína G	Apoptosis / Perturbación en la espermatogénesis	(Sian et al. 2013)
miR-34b-5p, miR-7686-5p	Foxj2	Factor de Transcripción	Apoptosis / Perturbación en la espermatogénesis	(Comazzetto et al. 2014)
miR-34b-5p, miR-7686-5p	Mllt3	Factor de Transcripción	Apoptosis / Perturbación en la espermatogénesis	(Urano et al. 2005)
miR-18a-5p	Hsf2	Factor de Transcripción	Apoptosis / Perturbación en la espermatogénesis	(G. Wang et al. 2004)
miR-18a-5p	Pten	Phosphatase	Apoptosis / Espermatogénesis disruption	(G. Wang et al. 2004)
miR-18a-5p, miR-20b-5p	Nfat5	Factor de Transcripción	Apoptosis de células germinales	(Drews-Elger et al. 2009)
miR-15b-5p	Stat3	Factor de Transcripción	Apoptosis de células germinales	(Z. He et al. 2013)
miR-15b-5p, miR-1981-5p	Strbp	Proteína de unión a Poli-A	Perturbación en la espermatogénesis	(Pires-daSilva et al. 2001)

miR-15b-5p, miR-20b-5p	Ccnd2	Regulador de CDK quinasas	Apoptosis de células germinales	(Sicinski et al. 1996; Li et al. 2000)
miR-15b-5p, miR-20b-5p	Ccnd1	Regulador de CDK quinasas	Apoptosis de células germinales	(Z. He et al. 2013)
miR-15b-5p, miR-20b-5p	Atg9a	Inductor de autofagia	Apoptosis de células germinales	(Yefimova et al. 2013)
miR-20b-5p	Itgb8	Integrina	Perturbación en la espermatogénesis	(Siu et al. 2003)
miR-20b-5p	Ccne1	Regulador de CDK quinasas	Apoptosis de células germinales	(Bonache et al. 2014)
miR-20b-5p	Bambi	Inhibidor de Tgf β	Perturbación en la espermatogénesis	(Loveland et al. 2003)
miR-382-5p	Capn8	Inhibidor de Calpainas	Apoptosis de células germinales	(Lizama et al. 2009; Coureuil et al. 2006)
miR-382-5p	Vim	Proteína del citoesqueleto	Perturbación en la espermatogénesis	(Shen et al. 2012)
miR-1291	Dnmt3a Dnmt3b	Cytoskeleton	DNA methylation	(Chédin 2011; Okano et al. 1999)

DISCUSIÓN

Los ftalatos y alquifenoles son considerados como PEs, que inducen efectos adversos sobre la salud reproductiva en humanos y en mamíferos machos (Toppari et al. 1996). Se ha postulado que ejercen su acción alterando principalmente, dos mecanismos: 1) Bioquímica y específicamente la esteroidogénesis, mediante la desregulación de la síntesis de hormonas esteroideas como testosterona y/o estradiol y 2) Fisiológicamente la espermatogénesis, incluyendo la vía de la apoptosis de células germinales.

En la literatura hay múltiples evidencias que indican alteraciones en el patrón de expresión génica inducida por la exposición a PEs durante estadios específicos del desarrollo. En este contexto los miRNAs como reguladores post-transcripcionales, toman especial relevancia por su gran versatilidad y su capacidad para una regulación fina y de respuesta rápida a estímulos externos. Sin embargo, se conoce muy poco sobre su función y la desregulación que sufrirían inducidas por la exposición a perturbadores endocrinos.

Los datos revelados en esta tesis doctoral muestran que la exposición crónica a una mezcla ftalatos y alquifenoles en bajas dosis inducen en el testículo de ratones, cambios en la expresión de miRNAs e isomiRs específicos que se correlacionan con una desregulación en la expresión de transcritos y proteínas implicados en disminución de los niveles de estradiol y en el aumento de la apoptosis de células germinales. Lo cual daría una explicación plausible a algunos de los defectos fenotípicos observados.

Características de nuestro estudio.

Estudios recientes sobre los efectos de los PEs en la salud humana, en comparación a otros modelos experimentales, han sugerido que los testículos de embriones de ratón responden de forma similar a los testículos de embriones humanos (Johnson et al. 2012). Lo cual, valida la elección y uso de un modelo murino en nuestra investigación y la extrapolación de nuestros resultados al hombre.

Las revisiones bibliográficas señalan que las investigaciones con PEs se han basado principalmente, en el estudio de compuestos individuales con dosis de exposición cercanas e incluso superiores a las definidas como LOAEL. La mayoría de estos estudios podrían no reflejar ni de forma temporal ni cuantitativa, el nivel de exposición crónica, al cual los seres humanos estamos sometidos, conceptualizándolo actualmente como “*exposoma*”. Además, dada la poca relación frecuentemente encontrada entre dosis y efecto, la extrapolación de estudios de efectos de perturbadores *in vitro* a *in vivo* debería ser observada con precaución (Charles et al. 2007). E inclusive, por ello se ha llegado a mencionar que muchos estudios podrían ser no relevantes para los riesgos a la salud humana (Nohynek et al. 2013).

Consecuentemente, se ha sugerido diseñar métodos para el estudio de los efectos de mezclas de diferentes tipos de los PEs sobre la salud reproductiva poniendo énfasis en el estudio de dosis equivalentes a los niveles de exposición en humanos (Kortenkamp 2014; Hauser & Sokol 2008). Sin embargo, la dificultad de definir niveles de exposición reales en humanos ha hecho complicada la elección de dosis a investigar. Tomando como ejemplo solo el DEHP se ha podido definir el rango de dosis NOAEL entre 60 a 3 mg/Kg/día (EU (European Commission) 2008). El nivel de exposición en humanos a DEHP por fuentes indirectas,

provenientes del medio ambiente, ha sido calculado cercano a los 0,017 mg/kg/día, en base a este dato y a los niveles de exposición por fuentes ocupacionales y medicas, se ha podido definir la ingesta tolerable diaria (ITD) para DEHP en 0,6 mg/kg/día (U.S. Food and Drug Administration 2003; European Commission 2008). La concentración de DEHP en nuestra mezcla es de 0,3 mg/kg/día. Lo cual indica que usamos dosis equivalentes de DEHP, a los niveles de exposición en humanos. Además, la mezcla elegida mostró no inducir una respuesta toxica (**Figura 10**). Por lo cual, los datos mostrados serán definimos como efectos a bajas dosis y podrían explicarse como una respuesta no-monotónica de estos compuestos.

Nuestro primer objetivo fue el caracterizar las alteraciones en la fisiología testicular en ratones machos, ello nos ayudo a reconocer el grado de daño a nivel de órgano, en dos aspectos importantes para nosotros. Primero, la síntesis de hormonas esteroideas y segundo, la muerte de células germinales.

Daño al testículo provocado por la exposición a ftalatos y alquifenoles de forma individual o como mezcla.

Es importante señalar que la exposición a ftalatos y alquifenoles como compuestos individuales o como mezcla indujo, en diferentes grados: disminución del tamaño de los túbulos seminíferos, degeneración/atrofia de túbulos seminíferos, hipertrofia de células de Leydig, alteración de la progresión de la espermatogénesis e incremento en la apoptosis de células germinales (**Figuras 14 a 20**). Se recalca además, que ciertos compuestos individualmente inducían un tipo de daño, mientras que no afectaban otros parámetros.

A priori, y tal como lo recomendado para los trabajos con mezclas de compuestos (Svingen 2015), se estableció un estudio comparativo entre los efectos sobre el sistema reproductivo, de la exposición de cada uno de los compuestos de la mezcla (efecto individual) y el efecto de la mezcla; de forma similar a lo señalado por Hayes y colaboradores (Hayes et al. 2006). Nuestros resultados son concluyentes en indicar que, cada uno de los ftalatos o alquifenoles que constituyen nuestra mezcla (dependiendo del parámetro que se evalué) se comportan como molécula efectora, otros neutrales o sin efecto e inclusive unos podrían tener una acción antagonista. Lo cual, otorgaría una explicación plausible a las similitudes y/o diferencias entre los efectos de compuestos individuales y el efecto de la mezcla. Además, es importante resaltar que, no se observaron efectos sinérgicos y/o aditivos en ninguno de los parámetros cuantificados.

Se evaluó como fin último, si la fertilidad de los animales expuestos a la mezcla de ftalatos y alquifenoles podría estar comprometida. Sin embargo, al revisar distintos parámetros de fertilidad, estos no resultaron globalmente afectados en todos los animales evaluados, solo en ciertas poblaciones de animales expuestos (**Tabla 9-figura 21**). Lo cual se debería a diferencias relativas e individuales en los niveles de exposición a los tóxicos ambientales desde ventanas muy tempranas del desarrollo de la gónada, ya sea por ejemplo: por la irrigación sanguínea materna en periodo fetal, número de embriones por gestación, por una mayor ingesta de los compuestos durante la lactancia y pubertad, o a diferentes tasas de metabolismo, acumulación y eliminación de los ftalatos y alquifenoles por cada animal. El hecho de que los ratones usados sean de una línea isogénica elimina o minimiza potenciales variaciones por factores genéticos.

El parámetro disminuido en estas poblaciones de animales fue el potencial de fertilidad o también llamado eficiencia de la implantación, lo cual podría indicar problemas en la carga génica de los espermatozoides, en los procesos de maduración del espermatozoide (motilidad, capacitación y reacción del acrosoma), o en el reconocimiento del espermatozoide por el ovocito. Además, datos preliminares de nuestro laboratorio que no forman parte de esta tesis doctoral, indican que en los animales expuestos, el recuento de espermatozoides epididimarios, esté disminuído (Gallardo & Moreno 2016, XXVII Reunion anual SChRD 2016, poster 1).

Siendo este trabajo el primero en su tipo, en relacionar los efectos de la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles con la expresión de miRNAs en los testículos, nos permite obtener una conclusión general de los posibles efectos a nivel global de la histología y fisiología testicular. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos se plantea la posibilidad de conocer con exactitud el o los tipos celulares, y su afectación en la diferenciación y el desarrollo que se muestren más específicamente alterados en cada uno de los parámetros evaluados. Por ello podríamos sugerir como futuras proyecciones, dirigir aproximaciones experimentales para corroborar los diferentes datos obtenidos, en distintos tipos de células testiculares aisladas, en líneas celulares *in vitro* u otros sistemas. En especial en: los espermatozoides y su capacidad fecundante con aproximaciones experimentales que involucren ensayos de fecundación *in vitro*, en ovocitos y cigotos.

Visión general de los cambios en la expresión de miRNAs e isomiRs, inducido por la exposición a una mezcla de perturbadores endocrinos.

Hasta la fecha de entregar de este manuscrito, no existía evidencia de que la maquinaria canónica de biogénesis de miRNAs, pueda verse alterada por la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles, lo cual otorga gran relevancia a los datos obtenidos.

Los datos señalaron un incremento en los niveles de *Drosha* en los testículos de los ratones, inducido por la Mezcla de PEs (**Figura 27**). En modelos de carcinomas, se ha asociado la sobre-expresión de *Drosha* con un aumento en los niveles de expresión de miRNAs maduros (Muralidhar et al. 2011). Lo cual indicaría un aumento en el procesamiento de pri-miRNAs o de otros sncRNAs. Además, *Drosha* no solo participaría en la biogénesis de miRNAs. Su sobre-expresión está involucrada en la activación de proteínas que conllevan a la disrupción de la espermatogénesis y a patologías reproductivas, según lo señala un análisis *in silico* realizado (**Anexo I-Figura 46**). Confirmando la implicación de esta enzima en la espermatogénesis (González-González et al. 2008; Wu et al. 2012), lo cual indica la importancia del estudio futuro de los cambios en su expresión y/o actividad inducidos por la exposición a PEs u otros tóxicos ambientales, sobre la salud reproductiva o su asociación en diversos tipos de cáncer.

En lo que respecta a la edición de las secuencias de RNAs, esta se ha planteado como uno de los principales mecanismos, por el cual tóxicos ambientales pueden sobrescribir información genética codificada (Mattick & Mehler 2008). En este trabajo se señala que en testículos de los ratones expuestos a la Mezcla de PEs aumenta la expresión de *Adar-1S* (**Figura 27**). Lo cual sugiere un incremento en la edición de mRNAs, pri-miRNAs y pre-miRNAs (Chawla & Sokol 2014), y una disminución en el procesamiento de miRNAs, por unión a los pre-miRNAs (Warf

et al. 2012) o estimulación de la actividad de Dicer (Ota et al. 2013). Todos ellos, serían enfoques muy interesantes a comprobar en futuras proyecciones de este trabajo.

Entre los mecanismos de estabilidad/degradación de miRNAs los datos muestran que, la exposición a la Mezcla de PEs aumenta la expresión de *Tut-4* (**Figura 28**). Existe evidencia que implica a esta proteína en la uridilación de histonas de mRNAs (Schmidt et al. 2011), en el decaimiento de mRNA durante la apoptosis (Thomas et al. 2015), en la regulación fisiológica de la expresión de miRNAs mediada por ácido retinoico (Thornton et al. 2014) y en cambios en la expresión de miRNAs inducidos por otros PEs como vinclozolina, (Briño-Enríquez et al. 2015). Esto indicaría que la sobre-expresión de *Tut-4* puede ser un mecanismo común frente a la exposición a PEs que induzcan apoptosis y señalización por receptores que unen ácido retinoico.

La expresión y actividad de *Lin28b* se mantuvo inalterada (**Figura 28**), corroborándose al observar la estabilidad en los niveles del miRNA *let-7a-1-3p* (**Figura 32-36**), el cual es conocido que se regula por *Lin28b* (Piskounova et al. 2011). En ausencia de *Lin28b*, *Tut4* induce mono/poli-uridilación de pre-miRNAs como mecanismos para su reparación o degradación (Kim et al. 2015). Sería importante en futuras investigaciones, corroborar si el control de la expresión de miRNAs por *Tut-4* está alterado por los PEs u otros tóxicos medioambientales, para inducir un estado patológico en un órgano o tejido concreto.

Por lo antes señalado, *Drosha*, *Adar-1S* y *Tut-4* estarían implicados en los cambios de expresión de algunos miRNAs. Pero al parecer, esta regulación no sería un mecanismo general, sino muy selectivo; dado que la exposición a la Mezclas de PEs no alteró globalmente el *miRNoma*, solo indujo cambios en la expresión de 10 miRNAs en el testículo (**Figura 34**).

Para corroborar si la exposición a la Mezclas de PEs induciría cambios selectivos en la

expresión de miRNAs, se estudiaron miRNAs de expresión similar a policistrones, que se transcriben como “*clústers*” bajo el control de un promotor único (Marco et al. 2013). Se tomó como ejemplo la familia *miR-17*, por tener un importante papel en la espermatogénesis (Tong et al. 2012; Xie 2016), se observó que de 13 miRNAs de esta familia detectados en el testículo, solo el *miR-20b-5p* y el *miR-18a-5p* alteraba su expresión (**Figura 33**).

Estos resultados sugieren que para los *miR-20b-5p* y *miR-18a-5p* su disminución involucra procesos de regulación post-transcripcional. Es curioso señalar que, Michlewski y colaboradores (Michlewski et al. 2010) determinaron que el procesamiento de *pri-miR-18a* podría ser selectivo e independiente del “*clúster*” al cual pertenece, gracias a la acción de la proteína de unión a RNA (Hnrnp A1) que actúa como un cofactor para el corte específico por Droscha (Guil & Cáceres 2007; Michlewski et al. 2010). Durante la exposición a la Mezcla de PEs, la selección del procesamiento de *miR18b-5p* posiblemente por la acción de Hnrnp A, favorecería su degradación por mecanismos donde participan Adar-1S o Tut-4, sugiriéndose como un nuevo mecanismo por el cual PEs u otros tóxicos ambientales desregulan la expresión de miRNAs.

Entre los miRNAs con cambios en su expresión, se señalaron solo dos que aumentaron sus niveles de acumulación. Sorpresivamente uno de ellos es el *miR-34b-5p*, (**Figura 34, 36, tabla 13, 15**). Este miRNA es muy abundante en los testículos. Además, es requerido en el control del desarrollo pos-mitótico de las células germinales y su deficiencia ha sido correlacionada con oligoasteno-zoospermia e infertilidad en ratones (Comazzetto et al. 2014), y con síndromes como: SSCS, atrofia mixta, y parada de células germinales, en biopsias de pacientes infértiles (Abu-Halima et al. 2014a; Abu-Halima et al. 2014b). Por tal motivo, señalamos que

podiera ser un buen bio-marcador del daño al testículo inducido por la exposición a tóxicos ambientales.

Por otro lado, *miR-7686-5p* aunque es un miRNA muy poco expresado, aumenta significativamente su expresión (**Figura 34, Tabla 15**). Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios previos que asignen una función a este miRNA en la fisiología celular.

Los datos también señalan 8 miRNAs con menores niveles de acumulación (**Figura 34, Tabla 15**). Entre ellos, destacan dos por su implicación en la fisiología testicular: 1) *miR-18a-5p* cuya ausencia deteriora la espermatogénesis (Xie et al. 2016), vía aumento en la expresión de dianas como *Hsf2* (factor de transcripción requerido durante la gametogénesis y en la diferenciación de espermatogonias (Wang et al. 2004); 2) *miR-15b-5p*, que participa en los mecanismos de supervivencia celular (Zhao et al. 2016), y se ha encontrado con menor nivel de acumulación en biopsias de pacientes infértiles que presentan SSCS (Abu-Halima et al. 2013). Además, Choi y colaboradores mostraron que sus niveles disminuyen en una línea celular derivada de células de Sertoli expuestas a NP (Choi et al. 2011). Dado que nuestra Mezcla de PEs también tiene entre sus componentes NP, podemos sugerir que la expresión del *miR-15b-5p* esta disminuida probablemente en células de Sertoli.

Los cambios de expresión de *miR-34b-5p*, *miR-15b-3p* y *miR-18a-5p* en testículos de ratones expuestos a la Mezcla PEs junto con el hecho de que poblaciones de ratones expuestos presenten una disminución en su potencial de fertilidad (**Figura 21**), sugiere importantes relaciones entre miRNAs y alteraciones en la espermatogénesis e infertilidad, mediadas por la exposición a Mezclas de PEs.

Para los otros miRNAs que disminuyen su expresión, existe información que participan en procesos y patologías en otros tejidos y sistemas como: cáncer (*miR20b-5p*, *miR-1291*)

(Leidinger et al. 2015; Luo et al. 2015), toxicidad en órganos inducida por fármacos (*miR-382-5p*) (Vliegthart et al. 2015), respuesta inflamatoria en tejidos, y diferenciación de condrocitos (*miR-3085-3p*) (Crowe et al. 2015). Sin embargo, el hecho que se hayan encontrado en el testículo, disminuidos en su expresión por la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles señala que pueden tener importantes funciones en la fisiología testicular aun no descubiertas, tal vez relacionadas con algunas de las detectadas en otros sistemas.

Por otro lado, esta investigación del “*miRNoma*” del testículo de ratón frente a la exposición a una Mezcla de PEs, es la primera en mostrar cambios en la expresión de variantes funcionales de miRNAs (isomiRs) en los animales expuestos. Los resultados señalan un número considerable de isomiRs que presentan desregulación en su expresión (**Figura 37, Tabla 12-15**). El mayor número de isomiRs (36) en relación al número de miRNAs canónicos alterados (10), se puede explicar por cambios pos-transcripcionales en los precursores de miRNAs donde posiblemente participe los mecanismos de edición o regulación de pre-miRNAs que encontramos alterados, o por polimorfismos tipo SNP (García-López et al. 2013).

Además, los resultados muestran que únicamente los isomiRs con adiciones y sustituciones en su región 3' están diferencialmente expresados y algunos de ellos son variantes de miRNAs canónicos que también se encontraron alterados (**Figura 38, Tabla 15**). Lo cual indica que se generan de un mismo precursor editado y que comparten los mismos mRNAs dianas, pudiendo potenciar la acción de los miRNAs. En concordancia con Cloonan y colaboradores, se señala que los isomiRs son biológicamente relevantes y que cooperan funcionalmente en el silenciamiento génico con sus miRNAs canónicos. (Cloonan et al. 2011).

Por ello, sugerimos primero validar los niveles de expresión de los isomiRs diferencialmente expresados, por alguna otra metodología como RT-qPCR o Northern blot. Además, futuras

investigaciones podrían enfocarse en dilucidar, el rol de los isomiRs como potenciadores de la actividad de miRNAs en la fisiología testicular y en el daño inducido por la exposición a PEs u otros tóxicos y su posible papel en terapias génicas o como biomarcadores.

En conclusión los cambios en la expresión de un pequeño grupo de miRNAs e isomiRs inducidos por la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles podrían ser suficientes para alterar procesos biológicos (Figura 39-40) que se asocian a disfunciones en el testículo con una posible afectación en la fertilidad masculina. De esta forma, la desregulación de los miRNAs e isomiRs encontrados podrían considerarse biomarcadores del efecto y de las consecuencias. Lo cual responde la primera parte de nuestra hipótesis. Sin embargo, nos falta por discutir si estos miRNA desregulados están implicados en dos aspectos importantes en este trabajo: primero, la síntesis de hormonas esteroideas y segundo, la apoptosis de células germinales.

Disminución en los niveles de estradiol y cambios en la expresión de transcritos y proteínas involucradas en la esteroidogénesis, inducido por la exposición a una mezcla de ftalatos y alquifenoles

Las células de Leydig, por su localización son de las primeras dianas del efecto a la exposición a la Mezcla de PEs, que llega desde la circulación sistémica. Una observación a recalcar es la aparición de focos o regiones de células de Leydig, que se visualizan hipertróficas e hiperplásicas. Mayormente, se observan alrededor de los túbulos seminíferos degenerados, cerca a la capsula testicular, preferentemente con la exposición a DBP, OP y a la Mezcla de

PEs (**Figura 16**). La sobre-expresión de la hormona luteinizante (LH), ha sido el principal mecanismo molecular en la etiología de la hiperplasia e hipertrofia de células de Leydig (Naughton et al 1998). Sin embargo, en modelos como el canino la disminución de los niveles de Cyp19a1 ha sido implicada como un mecanismo de tal patología (Walker & Nogués 1994). Aunque, la hipertrofia/hiperplasia de células de Leydig, *per se*, es considerada una condición de menor efecto patológico (Colecchia et al. 2007), se ha asociado con perturbación en la espermatogénesis, generación de tumores de células germinales, y con oligozoospermia y azoospermia en humanos (Lardone et al. 2013; Zimmerli 1991; Rich & Kerr 1979). Se desconocen los alcances de la hipertrofia/hiperplasia de células de Leydig inducido por la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles. Sin embargo, podemos asociarlo con alteraciones en la función celular, principalmente con la esteroidogénesis.

Los niveles de testosterona medidos en suero y en líquido intratesticular no se observan alterados por exposición a la Mezcla de PEs (**Figuras 11-12-113**), solo disminuyen con la exposición individual a DBP (**Figuras 13**), lo que sugiere que los efectos de compuestos individuales son distintos a la mezcla, y que el efecto sobre la testosterona del DBP pudiera ser compensado por los otros componentes en la exposición a la mezcla. Además, trabajos recientes *in vivo* e *in vitro* han sugerido que dosis repetidas de ftalatos o alquifenoles no afectan la producción de testosterona (Traore et al. 2016; Jambor et al. 2016), e inclusive algunos PEs al administrarse juntos, podrían antagonizar el aumento de testosterona que si se observa por la administración de compuestos individualmente (Jones et al. 2015).

En este trabajo la exposición a ftalatos y alquifenoles como compuestos únicos o como mezcla, disminuyó los niveles de estradiol en el líquido intratesticular, aunque los niveles séricos de estradiol no se encontraron alterados (**Figuras 11, 12**). Lo que señala una

perturbación endocrina directamente en el testículo, y a nivel sistémico posiblemente existiera un mecanismo compensatorio de la síntesis de estradiol por el tejido adiposo (Musi & Guardado-Mendoza 2014) estimulado por la exposición a PEs (Menale et al. 2015). Esto se relaciona, con el aumento de peso observado en los animales expuestos (**Figura 14**) y por ende un mayor contenido de tejido adiposo; tal y como se ha mostrado en las consecuencias obesogénicas de la exposición a varios PEs (Heindel et al. 2015).

La disminución de estradiol se relaciona directamente con cambios en la expresión de transcritos implicados en su síntesis (**Figuras 22-23**). Entre ellos, disminución en los niveles de los transcritos para *Sp1* y *Cyp11a1*, Es importante señalar que el promotor para *Cyp11a1* está bajo control del factor de transcripción *Sp1* (Shih et al. 2011), el que su vez es regulado a varios niveles por múltiples factores de transcripción y modificaciones post-traduccionales (Beishline & Azizkhan-Clifford 2015) y sumando en esta tesis, la pérdida de su expresión asociada a el aumento de *miR-34b-5p* y *miR-7686-5p*, lo cual indica su potencial sensibilidad a ser desregulado en su expresión por PEs. En concordancia con lo señalado en la literatura, *Cyp11a1* es una enzima cuyos niveles de mensajero y actividad enzimática pueden disminuir frente a conocidos PEs (Maeda et al. 2014).

Es interesante mostrar que cada ftalato o alquifenol en exposiciones de compuestos individuales es capaz de inducir disminución en la expresión del transcrito para *Star* tal como está evidenciado en la literatura (Clark & Cochrum 2007). Sin embargo, la exposición a la mezcla induce un aumento en la expresión del mismo transcrito. El mismo efecto se observa al cuantificar los niveles de *Cyp17a1* frente a la exposición individual a NP (disminuye la expresión) y a la Mezcla de PEs (aumenta la expresión) (**Figuras 22-23**), los que son claros efectos antagónicos a nivel de la mezcla y ejemplos claves en como las mezclas de PEs

pueden generar efectos no esperados, considerando solamente los efectos individuales de los compuestos.

Este aumento de la expresión de *Star* acompañado de un aumento de la disponibilidad de colesterol debería favorecer el flujo de colesterol, desde la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria, incrementando la tasa basal de la esteroidogénesis (Miller 1995). Sin embargo, en nuestro sistema no observamos un aumento de la esteroidogénesis sino una estabilización de los niveles de testosterona y una disminución en la síntesis de estradiol.

Considerando los mecanismos moleculares que gobiernan el transporte de colesterol, se ha observado que la unión del colesterol a Star es necesaria pero no suficiente para la transferencia del colesterol, ni para la inducción de la esteroidogénesis (Baker et al. 2007). Este proceso depende de la interacción del colesterol y Star, con un complejo proteico localizado en la membrana mitocondrial externa llamado "*transduceosome*" (Rone et al. 2009). En este complejo participa la proteína Vdac1 (canal aniónico 1 dependiente de voltaje) (cuyas funciones se discutirán más adelante), evitando la degradación de la forma fosforilada de Star, que es la que finalmente une y transporta el colesterol (Bose et al. 2008).

Analizando los cambios a nivel del proteoma del ratón (que se discutirán más adelante), sorpresivamente se observó que la Mezcla de PEs inducía una disminución de Vdac1 (**Figura 45**). De esta manera, podemos sugerir que pese a que hay un aumento en la expresión del transcrito de *Star* (por un mecanismo que propondremos más adelante), y probablemente un aumento en los niveles proteicos de Star, esta no podría unir ni transportar el colesterol a la mitocondria dada la posible carencia en su forma fosforilada, dependiente de Vdac1, cuyos niveles se encuentran disminuidos. Esto podría proponerse como un nuevo mecanismo por el

cual mezclas de PEs u otros tóxicos o estados patológicos, desregulan la producción de hormonas esteroideas.

El aumento del transcrito para *Cyp17a1* en los ratones expuestos a la Mezcla de PEs (**Figuras 22-23**) podría favorecer la síntesis de otro andrógeno como la androstenediona. Los niveles de androstenediona no fueron cuantificados en esta tesis, pero se ha mostrado en células de Leydig *in vitro* que la síntesis de androstenediona aumenta por exposición a alquifenoles como NP, aunque no cambie la actividad de *Cyp17a1* (Jambor et al. 2016). Desconocemos si la esteroidogénesis se encuentra detenida en algún paso, pero si proponemos un mecanismo vía miRNAs por el cual podría explicarse el aumento de *Cyp17a1*.

Curiosamente, DBP, NP y OP disminuyen los niveles de mensajero de *3β-Hsd* (una de las principales enzimas para la producción de testosterona), y DBP también disminuyó los niveles de testosterona, lo cual está en concordancia con los reportes de la literatura (Motohashi et al. 2016; Ye et al. 2011). Sin embargo, al exponer a los animales a la mezcla de estos compuestos, los niveles de este transcrito y de testosterona no se encuentran alterados (**Figuras 22-23**). Estos resultados refuerza aún más la idea que el efecto de compuestos individuales sobre diversos parámetros biológicos no necesariamente es el mismo en una mezcla de ellos.

Finalmente, la expresión de aromatasa a nivel de su transcrito se encontró disminuida, por cada uno de los compuestos así como por la mezcla, y a nivel de la proteína también se observó disminuida por la exposición a la Mezcla de PEs, (**Figuras 22 a 26**). Este resultado está en concordancia con los trabajos de Sekaran y Benachour que mostraron que la exposición a NP y DEHP disminuyen los niveles de estrógeno vía cambios en la expresión y la actividad de la aromatasa (Sekaran & Jagadeesan 2015; Benachour et al. 2007), y señalan al transcrito de *Cyp19a1* como el más sensible a la acción de los perturbadores endocrinos.

Resultó muy interesante poder definir como evidencia de un evento molecular inicial alterado, el periodo dentro de las ventanas del desarrollo de los testículos de ratón, en el cual se reflejaría la disminución de los niveles de *Cyp19a1*. Los datos revelaron que la exposición a la Mezcla de PEs, no altera la expresión de aromatasa en la gónada embrionaria de 14.5 dpb. Sin embargo, se empieza a observar una disminución significativa en los testículos de los ratones neonatos de 3 días post-parto (**Figura 24**). Que los niveles del mensajero de aromatasa se mantengan inalterables en gónadas de embriones expuestas a mezclas de ftalatos y alquifenoles, posiblemente se relaciona con la inicialmente nula participación de esta enzima en el desarrollo de la gónada. Lo cual, ha sido corroborado en los modelos de ratones transgénicos, carentes de esta enzima (*ArKO*^{-/-}), que tampoco presentan alteraciones en el testículo durante el desarrollo y en la pubertad (Murata et al. 2002). Esto, sugiere que es precisamente en la adultez y senescencia donde el efecto de los ftalatos y alquifenoles o sus mezclas sobre la expresión de *Cyp19a1*, podría tener mayores consecuencias en la fisiológica reproductiva.

En resumen, los datos presentados en esta tesis doctoral exponen que la diana, por el cual mezclas de ftalatos y alquifenoles podrían estar ejerciendo su acción es a través de la disminución en los niveles de estradiol, lo cual estaría mediado por la desregulación en la expresión de los genes implicados en su síntesis, principalmente aromatasa. Ello, plantea la interrogante sobre si la desregulación de estos transcritos estuviera dirigida por los miRNAs que encontramos diferencialmente expresados.

Participación de los miRNAs diferencialmente expresados por la exposición a la Mezcla de PEs, en la disminución en la síntesis de estradiol.

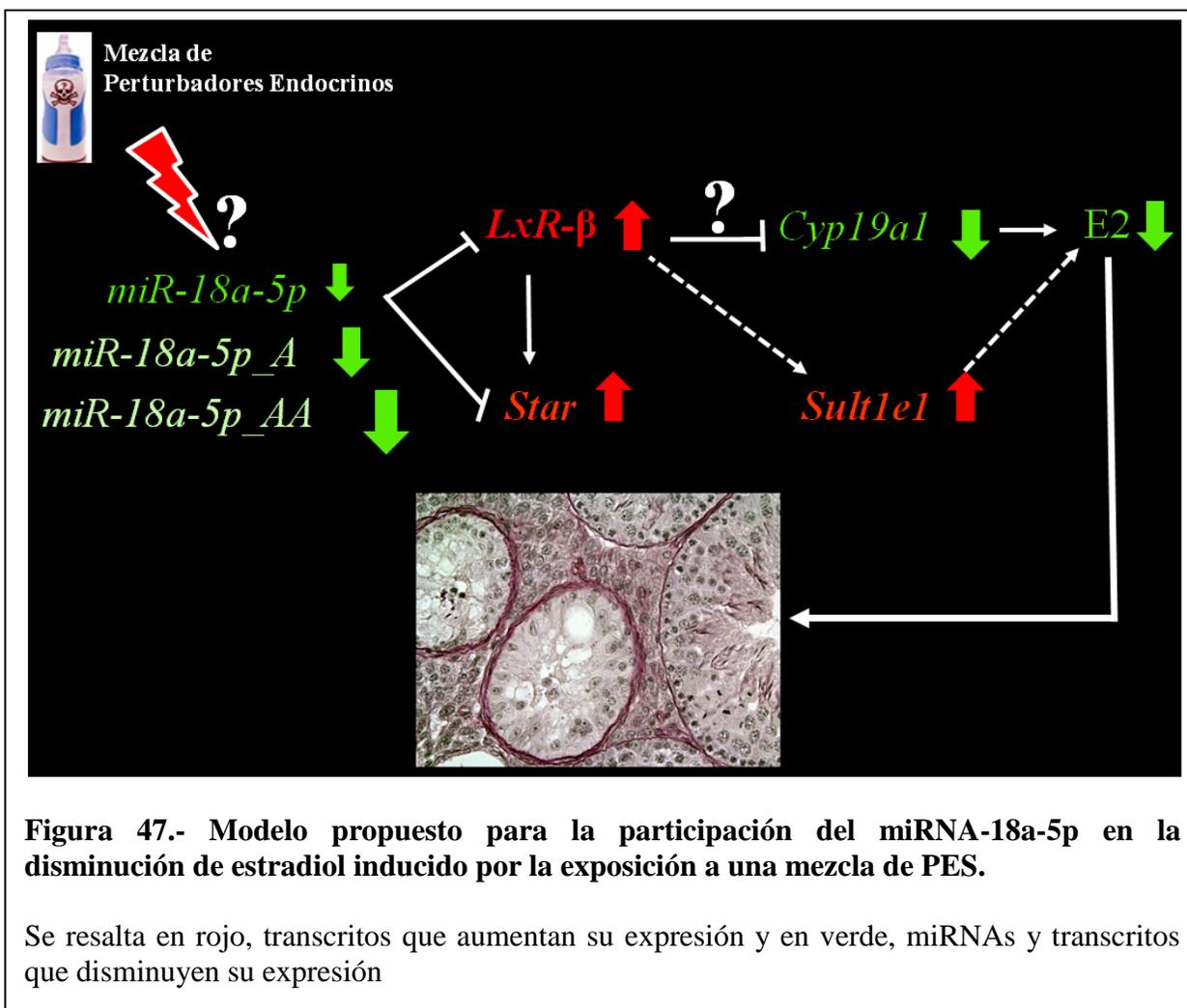
El análisis global de las interacciones entre las proteínas que dirigen la síntesis de estradiol, sus reguladores transcripcionales, y el control pos-transcripcional mediado por los miRNAs diferencialmente expresados (**Anexo I-Figura 29**), principalmente nos señaló que la ausencia de *miR-18a-5p* favorecería la sobreexpresión de *Star*. Sin embargo, la sobreexpresión de *Star* no implicaría directamente la disminución de estradiol; su aumento sería un mecanismo para compensar la ausencia de su forma fosforilada como mencionamos anteriormente.

Este análisis también reveló que *miR-18b-5p* regularía la expresión de *LxR-β*, la cual es una proteína que pertenece a una superfamilia de factores de transcripción activados por ligandos. *LxR-β* (*Nr1h2*) se expresa en células de Sertoli y germinales. Sus principales ligandos son los esteroides (productos del metabolismo del colesterol y de la síntesis de hormonas esteroideas), cuyos niveles se han detectado aumentados en patologías asociadas con estrés oxidativo y con sucesos de muerte celular programada (Larsson et al. 2006). Después de su activación, *LxR-β* heterodimeriza, con *RxR* para acoplarse a elementos de respuesta encontrados en las regiones de sus promotores, y así regular la esteroidogénesis y la espermatogénesis.

Los ratones machos deficientes para este receptor (*LxR-β^{-/-}*) presentan daño en el testículo, alteraciones en el metabolismo de los lípidos, disminución en la proliferación de células germinales y bajos niveles de testosterona. Pero, solo el doble mutante para *LxR-α;β^{-/-}* llega a ser infértil entre 6 y 8 meses (Maqdasy et al. 2015; Volle et al. 2007). Del mismo modo, las hembras mutantes para *LxR-β^{-/-}* al ser súperovuladas presentan altos niveles de estradiol, y de forma no concordante bajos niveles del transcrito de aromatasa (Mouzat et al. 2009). Hay

evidencias que señalan a LxR- β como un regulador transcripcional para *Star*, *Cyp11a1*, y *Sult1e1* (sulfotransferasa de estrógeno, encargada del metabolismo de estradiol) (He et al. 2010). Al mismo tiempo, (vía un mecanismo aun poco conocido) se ha propuesto a los LxR como reguladores negativos de la expresión y actividad de aromatasas y de la posterior síntesis de estradiol (Simpson et al. 2002). Por otro lado, se ha podido determinar en hígado de ratón y en testículos de ratones y humanos que la exposición a ftalatos y alquifenoles, incrementan los niveles de LxR- β (Rouiller-Fabre et al. 2015).

En esta tesis, se corroboró un aumento en la expresión de *LxR- β* y una correlación negativa con la expresión de *miR-18a-5p* en testículos expuestos a la Mezcla de PEs (**Figura 43**). De este modo, se propone en esta tesis que la exposición a la Mezcla de PEs disminuye la expresión de *miR-18b-5p*, lo que aumentaría la expresión de LxR- β , incrementando la expresión de *Star*, y sulfotransferasas. Además, por un mecanismo aún desconocido regularía de forma negativa la expresión de *Cyp19a1*. Lo cual estaría relacionado con la disminución en el estradiol y en el fenotipo con alteraciones en el testículo (**Figura 47**).



Participación de los miRNAs diferencialmente expresados por la exposición a la mezcla de PES, en el incremento de la apoptosis de células germinales.

Aunque los sucesos de apoptosis en células germinales se consideran una respuesta fisiológica en el testículo, la exposición individual a ftalatos, alquifenoles y como mezcla definida indujo un incremento de este tipo de muerte celular (**Figura 20**). Lo cual, es uno de los principales factores de la reducción del conteo espermático y de la pérdida de la fertilidad (Moreno et al.

2011). Múltiples evidencias han señalado que la exposición individual a los mismos ftalatos y alquifenoles empleados en este trabajo, induce apoptosis de células germinales. Principalmente por la redistribución y activación de receptores de apoptosis, activación de ROS, estrés en el retículo endoplásmico, disfunciones mitocondriales y cambios en la expresión y actividad de metaloproteasas, citoquinas, quinasas, fosfatasas y proteínas pro- y anti-apoptóticas (Sedha et al. 2015; Urriola-Muñoz et al. 2014; Vergara et al. 2011; Gong & Han 2006; Kasahara et al. 2002; Ichimura et al. 2003).

En lo que respecta al último punto, actualmente se han descrito más de 30 miRNAs como miRNAs pro y anti-apoptóticos (e incluso algunos con ambas funciones), por controlar la regulación pos-transcripcional de genes codificantes de proteínas anti y pro-apoptóticas, como un mecanismo clave para iniciar ese proceso (Wang 2010; Su et al. 2015)

Como señalamos, *miR-34b-5p* fue hallado sobre expresado en testículos de ratones expuestos a la mezcla de ftalatos y alquifenoles. Cabe recordar que, evidencias *in vivo* han señalado a los *miR-34a/b/c* como los principales microRNAs involucrados en la apoptosis de células germinales (Liang et al. 2012; Comazzetto et al 2014).

La vía por la cual se sobre-expresaría *miR-34b* es a través de la actividad de p53. Estudios recientes por ensayos de luciferasa y CHIP, han señalado que p53 puede unirse al promotor del gen que codifica al *pri-miRNA-34a/b/c* activando de esta forma su transcripción (Raver-Shapira et al. 2007; Tarasov et al. 2007). Además, p53 no solo puede regular a *mir-34b* a nivel transcripcional. Se ha observado que, por medio de su asociación con DDX5 (DEAD-box RNA helicase p68), p53 interactúa con Drosha y el complejo microprocesador, facilitando el procesamiento de *pri-miRNA* a *pre-miRNA* (Suzuki et al. 2009).

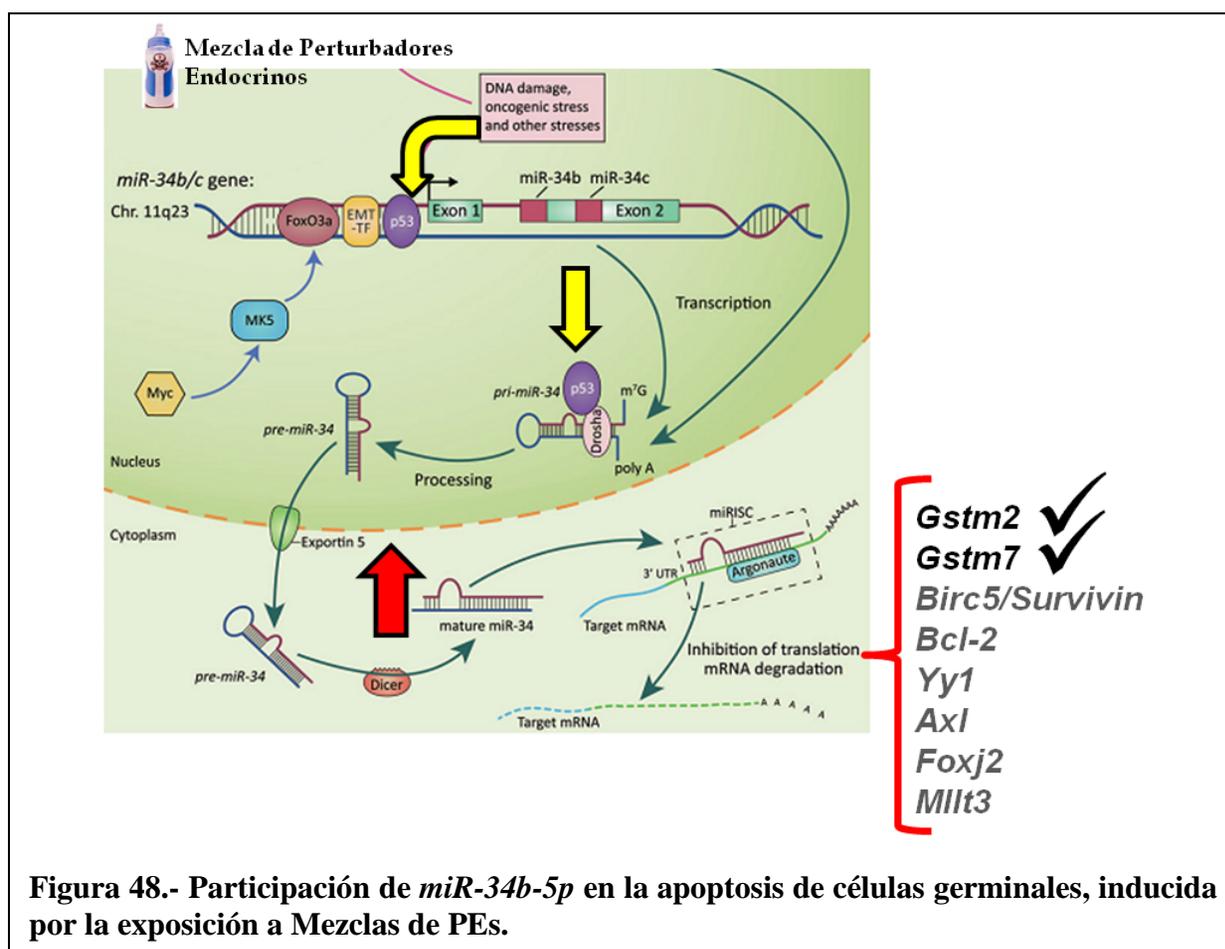
Del mismo modo, múltiples evidencias han señalado que ftalatos como DEHP, y alquifenoles como NP aumentan la expresión de p53 en células testiculares (Erkekoglu et al. 2010; Peng et al. 2016). Esto indicaría que vía la actividad de p53 inducido por la exposición a los PEs aumentaría la expresión de *miR-34b-5p*.

En la búsqueda de los genes dianas para *miR-34b*. Los análisis de proteómica comparativa revelaron una disminución en la expresión de dos iso-enzimas del grupo de las transferasas de glutatión (Gst) tipo mu, *Gstm2* y *Gstm7*, en testículos de ratones expuestos a PEs. Las cuales están implicadas en la apoptosis vía la inhibición en la fosforilación de la quinasa c-Jun (Jnk), y su asociación con miembros de la familia de proteínas que se unen a receptores tipo TNF (Cho et al. 2001; Wu et al. 2006). Además, *Gstm2* decrece su nivel relativo con el desarrollo testicular desde el nacimiento (Paz et al. 2006); estando asociada su expresión con espermatogonias pero no con células germinales maduras (Yu et al. 2003) y con células de Sertoli y Leydig (Benbrahim-Tallaa et al. 2002), lo cual sugiere que el efecto de los PEs estaría mayormente afectando, en esta vía, a esos tipos celulares y no tanto a células germinales en fases finales de la espermiogénesis.

Los mRNAs codificantes de ambas proteínas: *Gstm2* y *Gstm7*, resultaron ser dianas de *miR-34b-5p*. La relación inversa entre sus niveles de expresión estaría indicando una posible regulación pos-transcripcional en la expresión de *Gstm2* y *Gstm7* vía *miR-34b-5p*, lo cual constituye una evidencia de la participación de este miRNAs en la apoptosis en células testiculares, inducida por la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles, que requeriría ser validada en futuros modelos en distintos tipos celulares y estadios de la espermatogénesis.

Sin embargo, *Gstm2* y *Gstm7* no serían las únicas dianas de *miR-34b-5p*, implicados en la apoptosis de células germinales. Mediante las búsquedas realizadas *in silico* y la evidencia en

la literatura, se puede predecir que el aumento de *mir-34b-5p* favorecería el silenciamiento de la expresión de importantes genes anti-apoptóticos como *Birc5* (Survivin) (Huang et al. 2015), *Bcl-2* (Bommer et al. 2007) y otros transcritos que regulan el destino de las células germinales como: *Axl* (Mudduluru et al. 2011), *Creb* (Pigazzi et al. 2009), *Foxj2* (Comazzetto et al. 2014), *Mlt3* (Dalgard et al. 2009) e *Yy1* (Chen et al. 2011) (**Figura 48- Tabla 17**).



Toda la evidencia antes señalada. Indica que, *miR-34b-5p* es el principal mediador de la apoptosis de células testiculares inducida por PE. Sin embargo, este no es el único miRNA del testículo que podría estar implicado en este proceso.

Por otro lado, *miR-7686-3p* es un miRNA del que no se conoce su función. Aunque esta poco expresado en el testículo de ratón la exposición a la Mezcla de PE indujo un aumento de casi,

tres veces este miRNAs. Con ello, nuestras asociaciones *in silico* señalan que este miRNA puede participar en la disminución de la expresión de al menos tres proteínas implicadas en los procesos de apoptosis: Pdia3, Cct2 (chaperonas encargadas del plegamiento de proteínas) y Fkbp4 (chaperona encargada del transporte al núcleo de los complejos hormona-receptor) (**Figura 49, Tabla 17**). Lo cual sugiere la primera evidencia de la participación de este miRNA en la fisiología testicular, participando en la apoptosis de células germinales inducida por la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles PEs.

A través del análisis del proteoma antes señalado, se observó en los testículos de ratones expuestos a la Mezcla de PEs, un incremento de 9 proteínas que participarían en la apoptosis de células germinales (**Figura 44, Tabla 16**). Los análisis *in silico* señalaron que 7 genes codificantes a tales proteínas podrían ser regulados de forma pos-transcripcional por los miRNAs diferencialmente expresados (**Tabla 17**). Se puede hipotetizar que las células germinales que van a entrar en apoptosis establecen mecanismos por los cuales disminuyen los miRNAs que regulan el control pos-transcripcional de proteínas pro-apopticos.

La principal proteína pro-apoptica que aumentó su expresión, en los testículos de ratones expuestos a la Mezcla de PEs fue Diablo (Smac). La cual, se libera desde la mitocondria luego de un estímulo de apoptosis. En el citoplasma o en el núcleo celular, Diablo se une a proteínas inhibitoras de caspasas (IAPs) facilitando la degradación de los sustratos de las caspasas efectoras (Verhagen et al. 2000). Se ha observado que la carencia, tanto de gonadotrofinas como andrógenos, causa un aumento en la expresión de Diablo y su translocación al citoplasma en espermatozoides (Vera et al. 2006). Además, la exposición a ciertos metabolitos de ftalatos como MEHP induce, vía disminución de PI3K/Akt e incrementos de NF- κ B, apoptosis de células germinales por un incremento de Diablo (Rogers et al. 2008).

Los análisis *in silico* determinaron que de los 8 miRNAs que disminuyen su expresión, 5 de ellos (*miR-20b-5p*, *miR-382-5p*, *miR-3085-3p*, *miR-18a-5p*, *miR-1981-5p*) pueden controlar la expresión del transcrito para Diablo (**Tabla 17**). Esta asociación predice con una mayor probabilidad un aumento de esta proteína vía pérdida del control pos-transcripcional por los miRNAs disminuidos en su expresión.

A continuación, podemos señalar que, la sub-unidad beta tipo 4 del proteosoma (Psm4), fue otra proteína que mostro altos niveles de expresión en los testículos de ratones expuestos a la Mezcla de PEs (**Figura 44, Tabla 16**). Esta proteína colocaliza con caspasa 3 activa y está encargada de regular el ensamblaje del proteosoma y la degradación de proteínas (Hirano et al. 2008). Junto con ello, sus altos niveles se correlacionan con la disminución de proteínas como Pdia3 y Cct2, que favorecen la generación de fallos en el plegamiento de las proteínas.

El mRNA de Psm4 es diana de *miR-15b-5p* y *miR-20b-5p*, cuyos niveles de expresión se encuentran disminuidos después de la exposición a la Mezcla de PEs (**Figura 34, Tabla 15**). La correlación inversa entre el aumento de Psm4 y la disminución de *miR-15b-5p* y *miR-20b-5p* (**Tabla 17**), podría sugerir la participación de estos miRNAs desregulados por la Mezcla de PEs en los procesos de degradación de proteínas que acompaña a la apoptosis de células germinales.

En tercer lugar mencionamos al factor eucariótico iniciador de la traducción 4e (Eif4e), el cual forma parte del complejo EIF4F, que interactúa con los mRNAs facilitando su reclutamiento por la sub-unidad 43S del ribosoma, para su traducción. Entre los mecanismos de regulación de Eif4e, están principalmente las vías de señales PI3K/Akt, mTOR, y Ras/MAPK.

La sobre-expresión de *Eif4e*, es una características común en diversos tipos de cáncer, (Siddiqui & Sonenberg 2015). Sin embargo, el trabajo de López-Casas y colaboradores,

siguiendo un modelo de exposición crónica a MEHP y otros PEs (el cual sirvió de referencia para nuestro trabajo) encontró que, dependiendo del PEs y del periodo de exposición había cambios en la expresión de los transcritos del complejo EIF4F incluyendo *Eif4e* (López-Casas et al. 2012). Estos datos junto con los mostrados en esta tesis doctoral confirmarían que, esta proteína estaría respondiendo a la exposición a tóxicos medioambientales tanto individualmente o como mezcla. Probablemente, para favorecer la traducción de proteínas involucradas en las respuesta a estrés y a muerte celular (c).

Además, tal como lo señalado (en levaduras) por Ptushkina y colaboradores, se sugiere que la sobre-expresión de *Eif4e*, puede ser la respuesta celular para hacer frente a eventos de estrés y aumentar la traducción de proteínas específicas (Ptushkina et al. 2004). Los datos revelaron que el aumento de *Eif4e*, podría ser en parte consecuencia de la pérdida de varios miRNAs que controlan de forma pos-transcripcional su expresión, como los identificados: *miR-15b-5p*, *miR-20b-5p*, *miR-378b*, *miR-1981-5p*, *miR18a-5p*, *miR-382-5p* (**Figura 34-Tablas 15 y 17**).

Lo antes señalado, es la primera observación donde se sugiere una disminución de miRNAs que controlan la expresión de factores de iniciación de la traducción como *Eif4e* que aumentarían en respuesta a estrés. Lo cual sería un mecanismo previo a la generación de eventos de muerte celular inducidos por la exposición a PEs.

Del mismo modo, podemos mencionar otras proteínas cuyos aumentos de acumulación se correlacionan con la apoptosis de células germinales y con los miRNAs alterados; por ejemplo:

Hint1, que dirige un aumento de prostaglandinas y ceramidas (Gulbins 2003) y que es diana de *miR-1291*.

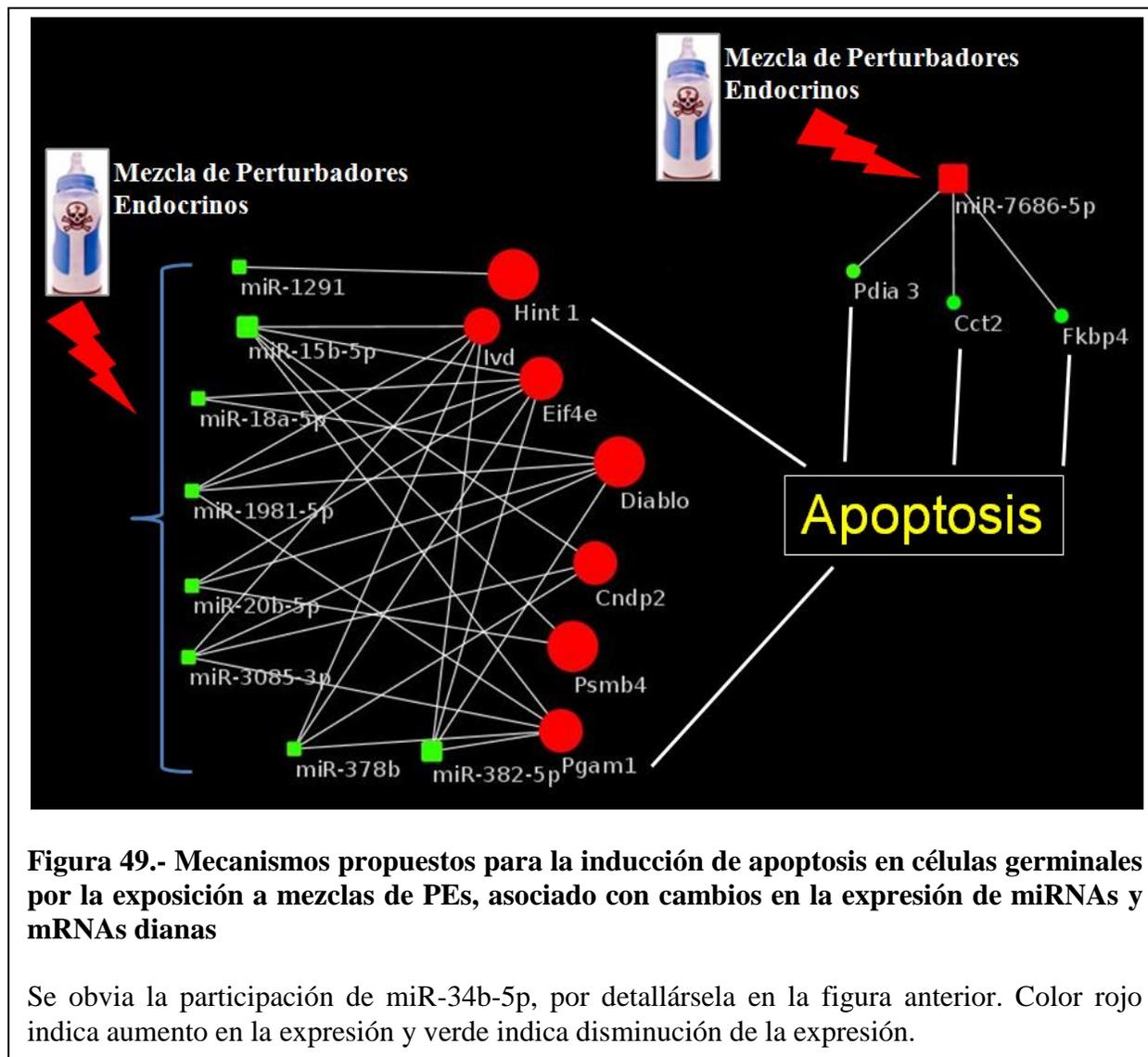
Ivd, que se ha reportado en respuesta a una sobrecarga de lípidos, induce una elevada β -oxidación de los ácidos grasos libres, lo cual podría inducir estrés en la mitocondria e incrementos en la producción de ROS (Tumova et al. 2015) y es diana de *miR-15b-5p*, *miR-378b*, *miR-3085-3p*, *miR-1981-3p*, *miR-382-5p*.

Pgam1, que es una importante enzima en la vía glicolítica, se ha encontrado disminuida en modelos de ratón con falla espermatogénica y asociada con la proliferación, migración y apoptosis de células germinales (Zhang S, et al 2015), a su vez es diana de *miR-15b-5p*, *miR-378b*, *miR-3085-3p*, *miR-1981-3p*, *miR-382-5p*

Finalmente, una reciente investigación sobre la actividad enzimática de *Cndp2* en el *metaboloma* celular, ha señalado que puede degradar lactato a sus metabolitos N-lactoil-aminoácidos (N-lac-Phe) (Jansen et al. 2015). Datos de nuestro laboratorio, señalan que lactato es el principal sustrato para la producción de ATP y un factor de supervivencia de los espermatozoides (Bustamante-Marín et al. 2012). Aunque, se desconoce la función de los metabolitos de lactato, se podría sugerir que la degradación de lactato vía actividad enzimática de *Cndp2* podría ser un nuevo mecanismo que influencia la apoptosis de células germinales. Los análisis señalaron que el aumento en la expresión de *Cndp2* estaría asociado a la pérdida del control pos-transcripcional mediado por *miR-15b-5p*, *miR-378b* y *miR-3085-3p* cuyos niveles de expresión están disminuidos.

En conclusión, estos datos reunidos son el primer reporte que involucra la participación conjunta de miRNAs específicos, como el *miR-34b-5p*, *miR-7686-5p*, *miR-20b-5p*, *miR-382-5p*, *miR-3085-3p*, *miR-378b*, *miR-18a-5p*, *miR-1981-5p*, *miR-15b-5p* y *miR-1291* en múltiples mecanismos de apoptosis de células germinales, inducidos por la exposición a mezclas de

ftalatos y alquifenoles, a través de la pérdida o activación del control postranscripcional de varias proteínas pro y anti-apoptóticas (**Figura 49**).



Alcance de nuestro estudio

El factor masculino es responsable del 50% de los casos de infertilidad en humanos. Dentro de los pacientes diagnosticados azoospermicos no obstructivos (NOA) con falla espermatogénica primaria, se estima que en la mitad de ellos no es posible identificar la causa de su infertilidad (Irvine DS. 2015). Sin embargo, se ha asociado la etiología de la falla espermatogénica primaria con la exposición a perturbadores endocrinos como factor responsable de las alteraciones testiculares, e inclusive se ha relacionado de forma inversa la presencia de estos compuestos a la concentración y motilidad espermática en NOA (Kranvogel et al. 2014).

Los hombres que padecen NOA han mostrado una disminución relativa de la relación sérica de testosterona a hormona luteinizante y altos niveles de 17β -estradiol (Lardone et al. 2013). Al mismo tiempo, se ha reportado la participación de cambios en la expresión de múltiples genes involucrados en la apoptosis de células germinales (Tripathi et al. 2009; Yu & Huang 2015) y cambios en la expresión de genes encargados de la regulación de la síntesis de hormonas esteroidales, por ejemplo una disminución en la expresión de $LXR\alpha/\beta$ (Ronandino et al 2014). Cabe señalar que en esta tesis doctoral se encontró en los testículos de los animales expuestos a la Mezcla de PEs, un aumento de los niveles de 17β -estradiol y cambios en la expresión de varios de los transcritos de dichos genes relativos a la apoptosis y a la síntesis hormonal como *Lxr- β* . De igual forma en pacientes NOA también se han encontrado cambios en la expresión de los mismos miRNAs (Abu-Halima et al. 2014a; Zhuang X. et al 2015) reportados por nosotros en los animales expuestos a la Mezcla de PEs.

Por ello, el alcance de nuestro trabajo radica en la posibilidad de conectar las alteraciones que podrian inducir infertilidad masculina, principalmente la disminucion de estradiol intratesticular y la apoptosis de células germinales con la exposición a mezclas de flalatos y alquilfenoles, brindando como posible mecanismos la desregulación de miRNAs testiculares que controlan la expresión de genes involucrados en los procesos antes señalados, lo cual brinda la posibilidad de establecer a los miRNAs como una terapia farmacológica especifica y eficaz para ciertos tipos de fallas testiculares primarias.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:

La presente tesis doctoral, nos ha permitido resumir las siguientes conclusiones:

- ✓ La exposición crónica a una mezcla definida de ftalatos y alquifenoles en dosis equivalentes a los niveles de exposición en humanos, tiene efectos de perturbador endocrino en ratones machos, que se ven reflejados en alteraciones moleculares, histológicas y funcionales en los testículos. El principal efecto como perturbador endocrino es la disminución de los niveles intratesticulares de estradiol, por mecanismos que implican la desregulación en la expresión de enzimas de la vía esteroidogénica, en especial la disminución de aromatasa.
- ✓ La exposición crónica a una mezcla de ftalatos y alquifenoles induce una sobreexpresión a nivel de mRNA, de las enzimas implicadas en los mecanismos de biogénesis (Drosha), edición (Adar-1S) y estabilidad de miRNAs (Tut-4).
- ✓ Pequeños cambios en el *miRNoma*, inducidos por la exposición a la mezcla de ftalatos y alquifenoles. Principalmente un aumento de *miR-34b-5p* y una disminución de *miR-15b-5p* y *miR-18a-5p*, implicados en la fisiología testicular y amplificada por la participación de sus variantes o isomiRs, estarían afectando importantes procesos biológicos y asociándose con un fenotipo alterado en el testículo de ratón.
- ✓ *miR-18a-5p* estaría relacionado con la disminución en la producción de estradiol inducida por la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles, a través de un circuito regulatorio en el cual la disminución de *miR-18a-5p*, influiría por pérdida del control

pos-transcripcional en el aumento de la expresión de *LxR-β*; lo que aumentaría la expresión de *Star* y *Cyp17a1* y regularía negativamente la expresión de aromatasa.

- ✓ *miR-34b-5p* al regular la expresión de genes involucrados en la supervivencia celular, podría ser un efector clave de la apoptosis de células germinales, inducida por la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles. Además la disminución en la expresión de *miR-1291*, *miR-15b-5p*, *miR-20a-5p*, *miR-378b*, *miR-3085-3p*, *miR-1981* y *miR-382*, parecería relacionarse con en el aumento de apoptosis de células germinales, mediante mecanismos donde su ausencia induciría una sobre-expresión de proteínas como: Diablo, Psbm4, Eif4e, Hint1, Ivd y Cdn2, que dirigen la apoptosis en células testiculares.

PERSPECTIVAS FUTURAS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A PEs Y SUS MEZCLAS SOBRE LA SALUD HUMANA.

Cada vez se hace más evidente el efecto reprotoxico de la exposición a los PEs. Es más, los datos epidemiológicos junto con los resultados de esta tesis sugieren aumentar los estudios de los efectos de mezclas de PEs al *exposoma* en humanos. Analizando al mismo tiempo las alteraciones en varios periodos como: la etapa postnatal, la infancia, la pubertad y la senescencia, tanto en machos como en hembras y relacionar los resultados encontrados con patologías reproductivas, efectos en otros sistemas y diversos tipos de patologías como cáncer. Además se debería profundizar en los efectos de la exposición a mezclas de ftalatos y alquifenoles sobre células somáticas y células germinales aisladas, especialmente el efecto directo sobre los espermatozoides, ovocitos y cigoto mediante aproximaciones experimentales *in vitro* e *in vivo*, que puedan establecer el riesgo real de la exposición a estos compuestos sobre la fertilidad.

Por otro lado, se debería profundizar más en el papel del estradiol sobre la fisiología testicular, junto con el efecto real de la exposición a diferentes mezclas de PEs sobre la síntesis de los estrógenos, evaluándolo a nivel testicular.

PERSPECTIVAS FUTURAS AL ESTUDIO DE miRNAs Y SU PARTICIPACIÓN EN LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A MEZCLAS DE PEs

La participación de los miRNAs e isomiRs desregulados por la exposición a ftalatos y alquifenoles y asociados con los cambios de expresión en transcritos y proteínas que regulan la síntesis de estradiol y la apoptosis de células germinales, deberá ser validada por ensayos *in vitro* o *in vivo*, para establecer la certeza biológica de las diferentes proposiciones planteadas.

En esta tesis, se inicio el estudio de la regulación y función de los miRNAs en la exposición a una mezcla definida de PEs. Sin embargo, se debería continuar estudiando la función de sus variantes o isomiRs, como potenciadores y modificadores de la actividad de miRNAs, en la fisiología testicular y en el daño inducido por la exposición a PEs u otros tóxicos medioambientales; además de su posible uso en terapias génicas o como bio-marcadores.

Además, futuras investigaciones podrían direccionar sus esfuerzos para dilucidar la participación de miRNAs de nueva predicción, y otros RNA no-codificantes como: pi-RNAs, endo-siRNAs, circ-RNAs, snoRNAs, lncRNAs etc. Tanto en la fisiología reproductiva como en las patologías asociadas a la exposición a PEs y otros tóxicos medioambientales.

Finalmente, se sugiere para la continuidad de este trabajo así como en futuros trabajos relacionados, el estudio combinado de varias aproximaciones “ómicas” (ampliando algunas de las planteadas conjuntamente en esta tesis), que puedan establecer conclusiones integradas a nivel de sistemas biológicos, y que nos permitan entender en su conjunto como se están alterando los procesos en un sistema funcional definido, como por ejemplo gametogénesis y sus consecuencias sobre la reproducción.

ANEXO

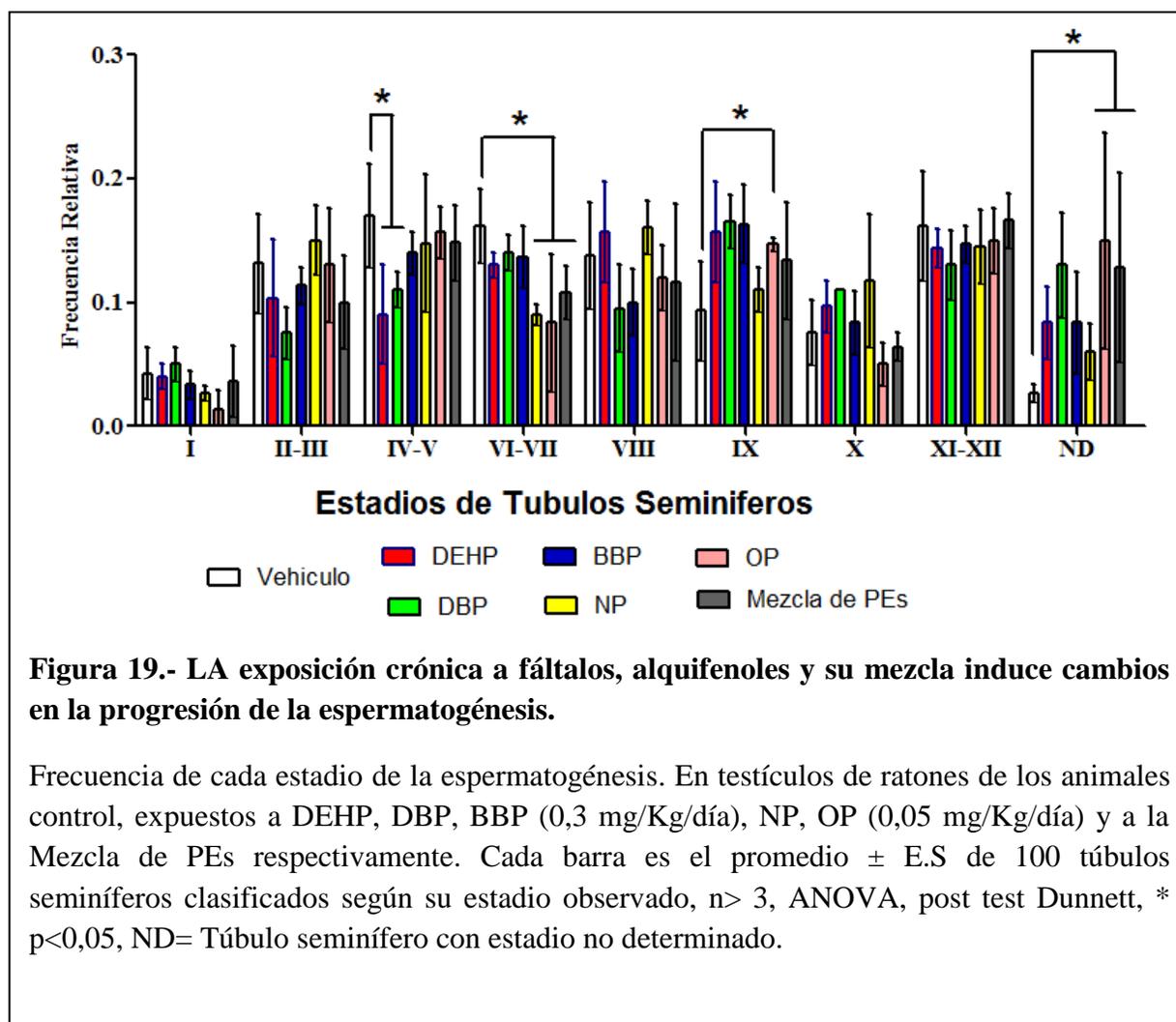
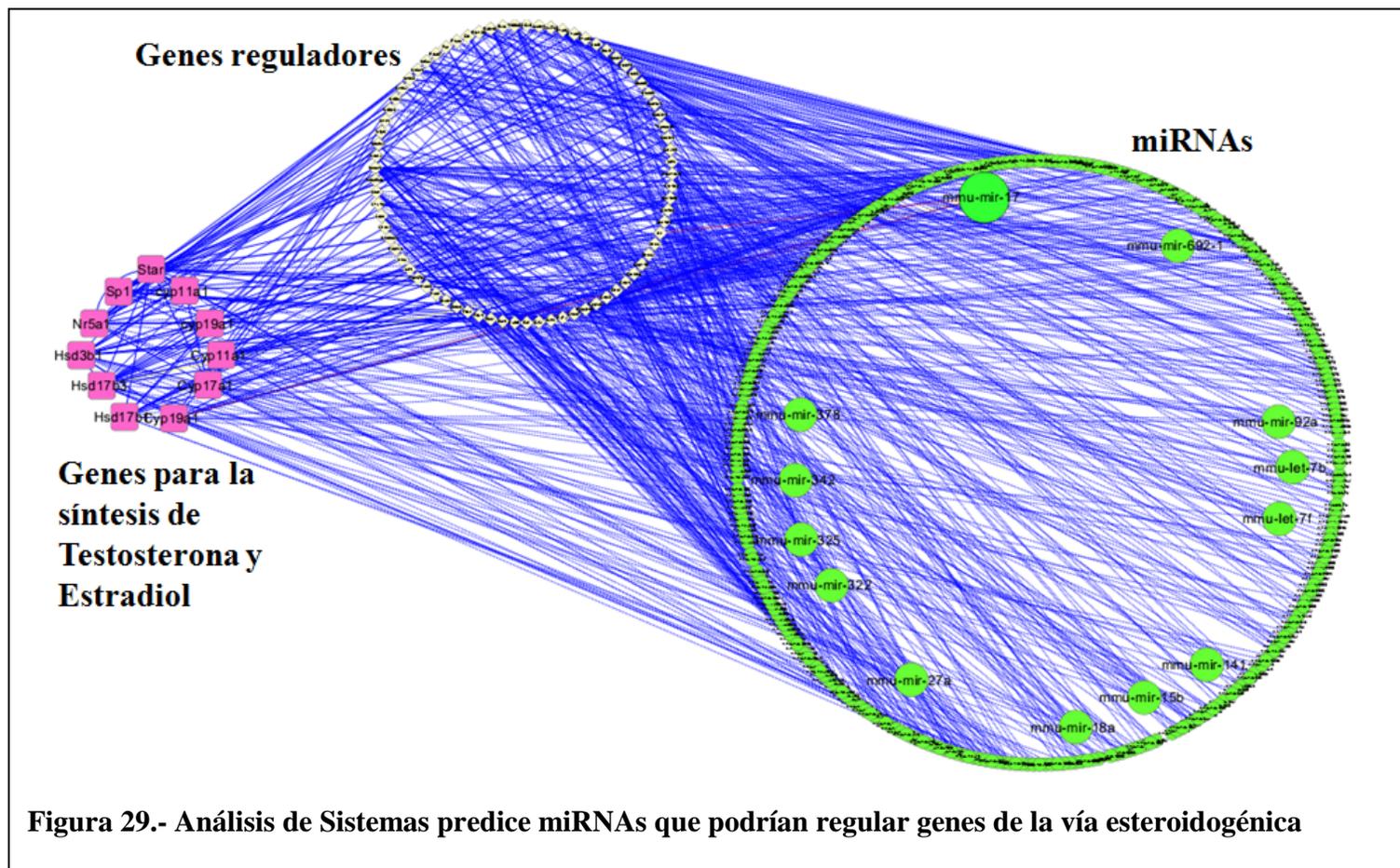
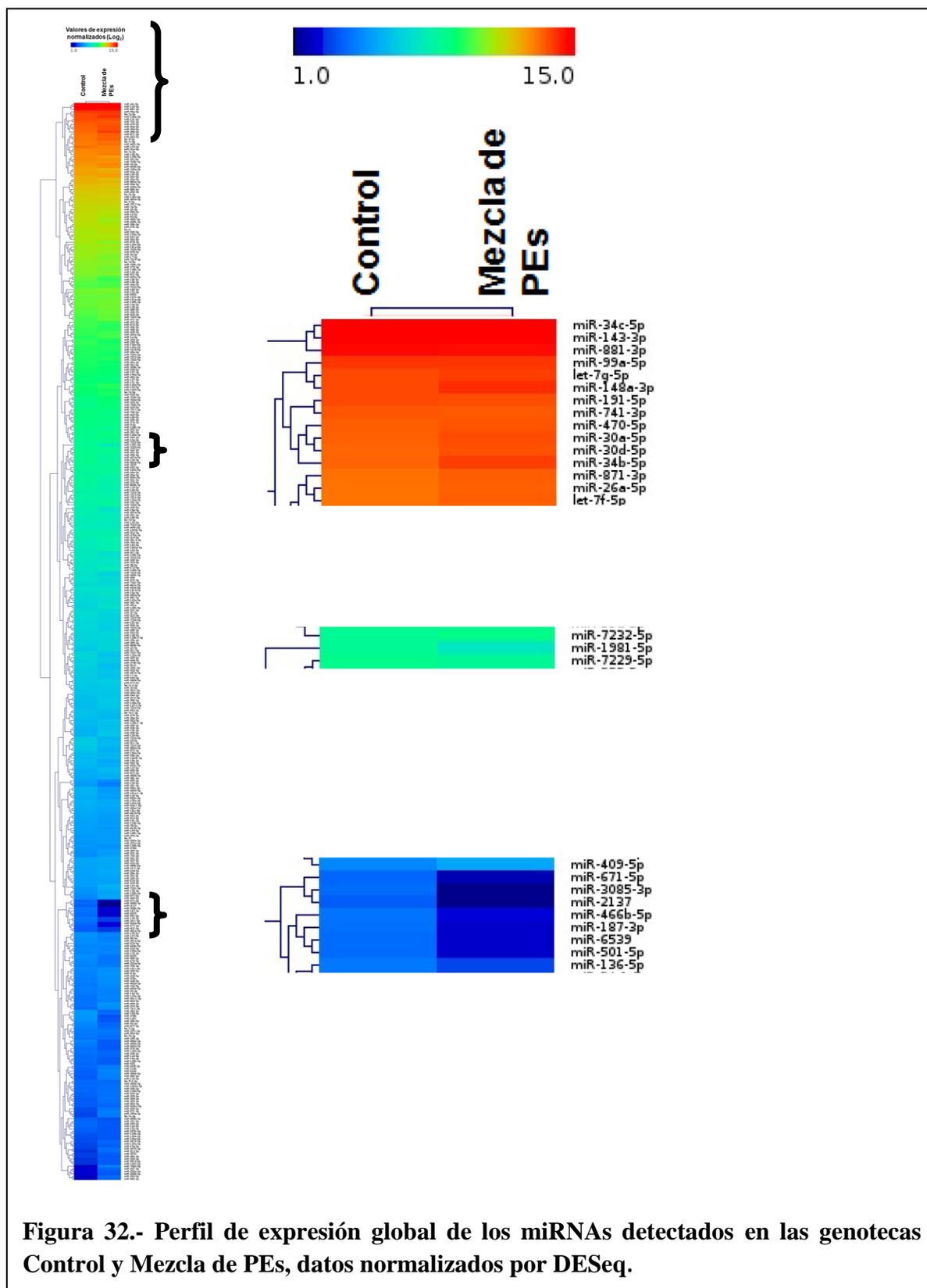


Tabla 10.- Resumen del efecto de la exposición a perturbadores endocrinos o a su mezcla, sobre los niveles de mRNAs implicados en la síntesis de estradiol.

	DEHP	DBP	BBP	NP	OP	Mezcla
<i>Sp1</i>	↓	↓	↓	-	-	↓
<i>Star</i>	-	↓	-	-	↓	↑
<i>Cyp11a1</i>	-	↓	-	-	↓	↓
<i>Cyp17a1</i>	-	-	-	↓	-	↑
<i>3β-Hsd</i>	-	↓	-	↓	↓	-
<i>Cyp19a1</i>	↓	↓	↓	↓	↓	↓





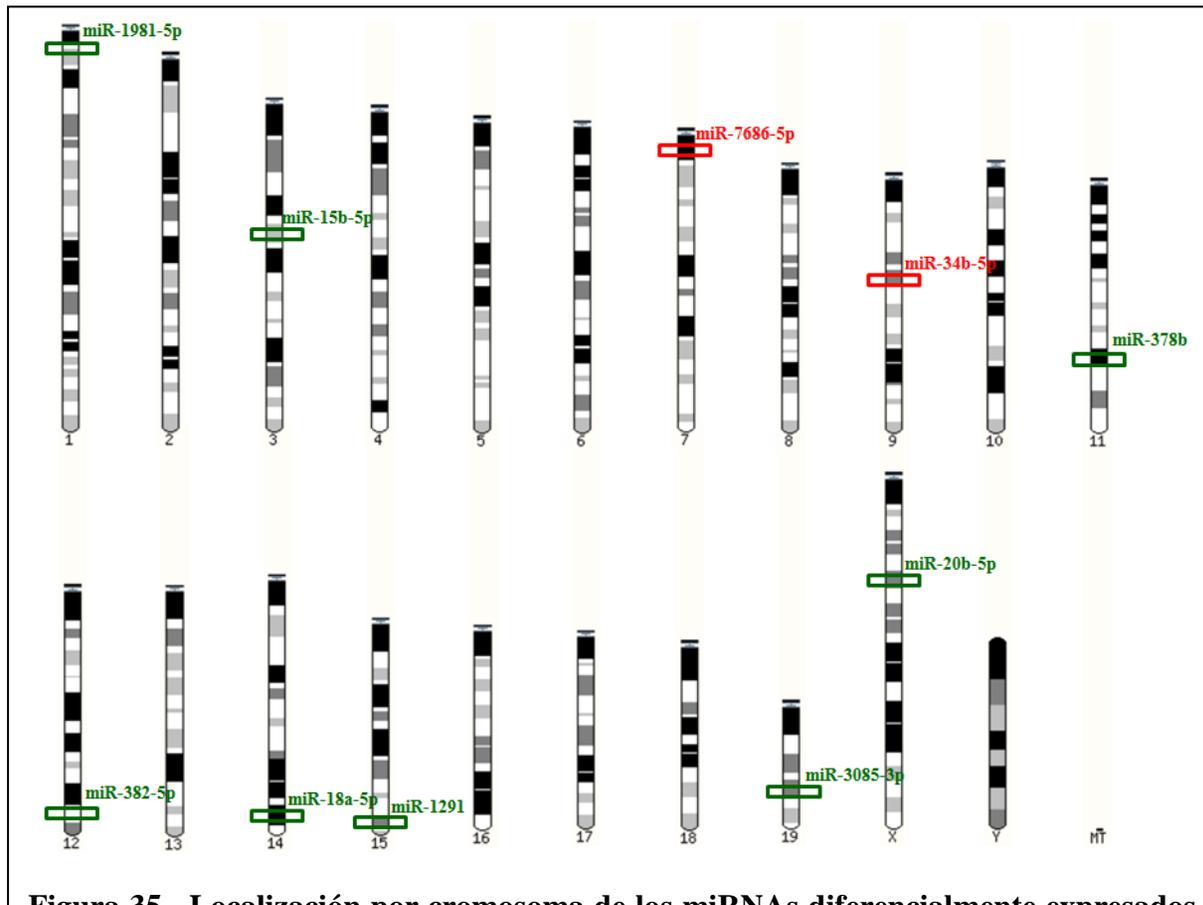


Figura 35.- Localización por cromosoma de los miRNAs diferencialmente expresados por la exposición a Mezclas de PEs.

Ensembl (GRCm38), cariotipo de ratón. miRNAs en rojo están sobre-expresados y miRNAs en verde esta disminuidos.

Tabla 14. Análisis de la expresión de los miRNAs de la familia *Mir-17* en las genotecas de secuenciación.

Familia	Cluster	miRNA	Control		Mezcla de PEs		Tasa de cambio (Log ₂)	valor-p
			No. de moléculas secuenciadas	% de moléculas secuenciadas	No. de moléculas secuenciadas	% de moléculas secuenciadas		
<i>miR-17</i>	<i>miR-17~92</i>	miR-17-3p	76	0,0147	60	0,0112	-0,3459	ns
		miR-17-5p	1760	0,3415	1339	0,2505	-0,3949	ns
		miR-18a-3p	13	0,0025	11	0,0021	-0,2989	ns
		miR-18a-5p	205	0,0398	140	0,0262	-0,5548	0,0481
		miR-19a-3p	366	0,0710	358	0,0670	-0,0285	ns
		miR-20a-5p	4850	0,9411	3920	0,7333	-0,3070	ns
		miR-92a-1-5p	41	0,0080	39	0,0073	-0,0634	ns
	<i>miR-106a~363</i>	miR-106a-5p	8	0,0016	10	0,0019	0,1866	ns
		miR-20b-5p	23	0,0045	10	0,0019	-1,2874	0,0500
		miR-19b-3p	1065	0,2067	926	0,1732	-0,2016	ns
		miR-92a-3p	5564	1,0796	5178	0,9686	-0,1038	ns
		miR-363-3p	7	0,0014	6	0,0011	-0,2285	ns
	<i>miR-106b~25</i>	miR-106b-3p	425	0,0825	380	0,0711	-0,1611	ns
		miR-106b-5p	169	0,0328	134	0,0251	-0,3280	ns
		miR-93-3p	20	0,0039	12	0,0022	-0,7463	ns
		miR-93-5p	2574	0,4995	2061	0,3855	-0,3207	ns
		miR-25-3p	3071	0,5959	2329	0,4357	-0,3991	ns
		miR-25-5p	32	0,0062	30	0,0056	-0,0935	ns

Tabla 15.- Lista completa de las poblaciones de miRNAs (precursores, canónicos e isomiRs) diferencialmente expresados.

Expresión de pre-miRNAs, miRNAs e isomiRs en testículos de ratones expuestos de forma crónica a la Mezcla de PEs comparados con los controles. Datos obtenidos por sncRNA-Seq y normalizados por DESeq, escala Log₂, *: p<0,05.

Tipo	Identificador	Control		Mezcla de PEs		Tasa de cambio (Log ₂)	valor-p	Expresión diferencial
		No. de secuencias	% de secuencias	No. de secuencias	% de secuencias			
Pre-miRNA	<i>mmu-miR-34b</i>	12835	2,3903	18182	3,7084	0,5025	0,0226	Aumentada
Pre-miRNA	<i>mmu-miR-1981</i>	348	0,0648	185	0,0377	-0,9134	0,0004	Disminuida
Pre-miRNA	<i>mmu-miR-15b</i>	1211	0,2256	822	0,1676	-0,5599	0,0096	Disminuida
Pre-miRNA	<i>mmu-miR-1291</i>	28	0,0052	10	0,0020	-1,5419	0,0124	Disminuida
Pre-miRNA	<i>mmu-miR-378b</i>	26	0,0049	9	0,0017	-1,6123	0,0131	Disminuida
miRNA	<i>mmu-miR-7686-5p</i>	4	0,0007	19	0,0038	2,3565	0,0059	Aumentada
miRNA	<i>mmu-miR-34b-5p</i>	10497	1,8976	15875	3,1490	0,5968	0,0130	Aumentada
miRNA	<i>mmu-miR-18^a-5p</i>	205	0,0371	140	0,0277	-0,5548	0,0481	Disminuida
miRNA	<i>mmu-miR-15b-5p</i>	1190	0,2152	804	0,1596	-0,5656	0,0115	Disminuida
miRNA	<i>mmu-miR-1981-5p</i>	320	0,0578	157	0,0311	-1,0274	0,0001	Disminuida
miRNA	<i>mmu-miR-382-5p</i>	27	0,0049	12	0,0023	-1,2120	0,0449	Disminuida
miRNA	<i>mmu-miR-20b-5p</i>	23	0,0042	10	0,0019	-1,2874	0,0500	Disminuida
miRNA	<i>mmu-miR-1291</i>	26	0,0047	10	0,0019	-1,4509	0,0227	Disminuida
miRNA	<i>mmu-miR-378b</i>	26	0,0047	9	0,0017	-1,6208	0,0130	Disminuida
miRNA	<i>mmu-miR-3085-3p</i>	13	0,0024	2	0,0004	-2,6208	0,0210	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-21a-5p_C</i>	1	0,0003	10	0,0032	3,3219	0,0226	Aumentada
isomiRs	<i>mmu-miR-202-5p_GA</i>	2	0,0006	14	0,0045	2,8074	0,0131	Aumentada
isomiRs	<i>mmu-miR-743b-5p_CA</i>	7	0,0020	22	0,0070	1,6521	0,0380	Aumentada

isomiRs	<i>mmu-miR-743b-5p_UCA</i>	8	0,0022	24	0,0077	1,5850	0,0379	Aumentada
isomiRs	<i>mmu-miR-18^a-5p_A</i>	104	0,0292	52	0,0166	-1,0000	0,0362	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-30c-5p</i>	96	0,0270	48	0,0153	-1,0000	0,0392	Disminuida
isomiRs	<i>Mmu-miR-878-3p_U</i>	392	0,1102	194	0,0620	-1,0148	0,0107	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-883b-3p_A</i>	63	0,0177	30	0,0096	-1,0704	0,0457	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-23a-3p_AA</i>	92	0,0259	43	0,0137	-1,0973	0,0258	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-878-5p</i>	59	0,0166	27	0,0086	-1,1278	0,0392	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-375-3p_AA</i>	43	0,0121	19	0,0061	-1,1783	0,0495	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-547-3p_</i>	108	0,0304	47	0,0150	-1,2003	0,0124	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-10b-5p_CA</i>	21	0,0059	49	0,0157	1,2224	0,0349	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-501-3p_A</i>	42	0,0118	18	0,0058	-1,2224	0,0438	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-465a-5p_CA</i>	25	0,0070	60	0,0192	1,2630	0,0218	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-106b-3p_A</i>	54	0,0152	22	0,0070	-1,2955	0,0225	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-106b-5p_AA</i>	33	0,0093	13	0,0042	-1,3440	0,0426	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-103-3p_GA</i>	27	0,0076	10	0,0032	-1,4330	0,0460	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-379-5p_AA</i>	25	0,0070	9	0,0029	-1,4739	0,0472	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-497a-5p_UA</i>	26	0,0073	9	0,0029	-1,5305	0,0375	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-339-5p</i>	41	0,0115	13	0,0042	-1,6571	0,0092	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-7217-3p_U</i>	19	0,0053	6	0,0019	-1,6630	0,0497	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-883a-3p_AA</i>	20	0,0056	6	0,0019	-1,7370	0,0378	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-320-3p_AAA</i>	15	0,0042	4	0,0013	-1,9069	0,0492	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-15b-5p_AA</i>	27	0,0076	7	0,0022	-1,9475	0,0104	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-871-5p_UUA</i>	13	0,0037	3	0,0010	-2,1155	0,0472	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-148b-3p_AA</i>	14	0,0039	3	0,0010	-2,2224	0,0331	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-1981-5p_A</i>	26	0,0073	5	0,0016	-2,3785	0,0035	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-let-7c-5p_AAA</i>	11	0,0031	2	0,0006	-2,4594	0,0433	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-741-3p_AUA</i>	11	0,0031	2	0,0006	-2,4594	0,0433	Disminuida

isomiRs	<i>mmu-miR-18a-5p_AA</i>	12	0,0034	2	0,0006	-2,5850	0,0289	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-500-3p_U</i>	12	0,0034	2	0,0006	-2,5850	0,0289	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-20b-5p_A</i>	12	0,0034	2	0,0006	-2,5850	0,0289	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-760-3p_GA</i>	10	0,0028	1	0,0003	-3,3219	0,0226	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-3085-3p_UA</i>	11	0,0031	1	0,0003	-3,4594	0,0143	Disminuida
isomiRs	<i>mmu-miR-425-3p_CA</i>	13	0,0037	1	0,0003	-3,7004	0,0058	Disminuida

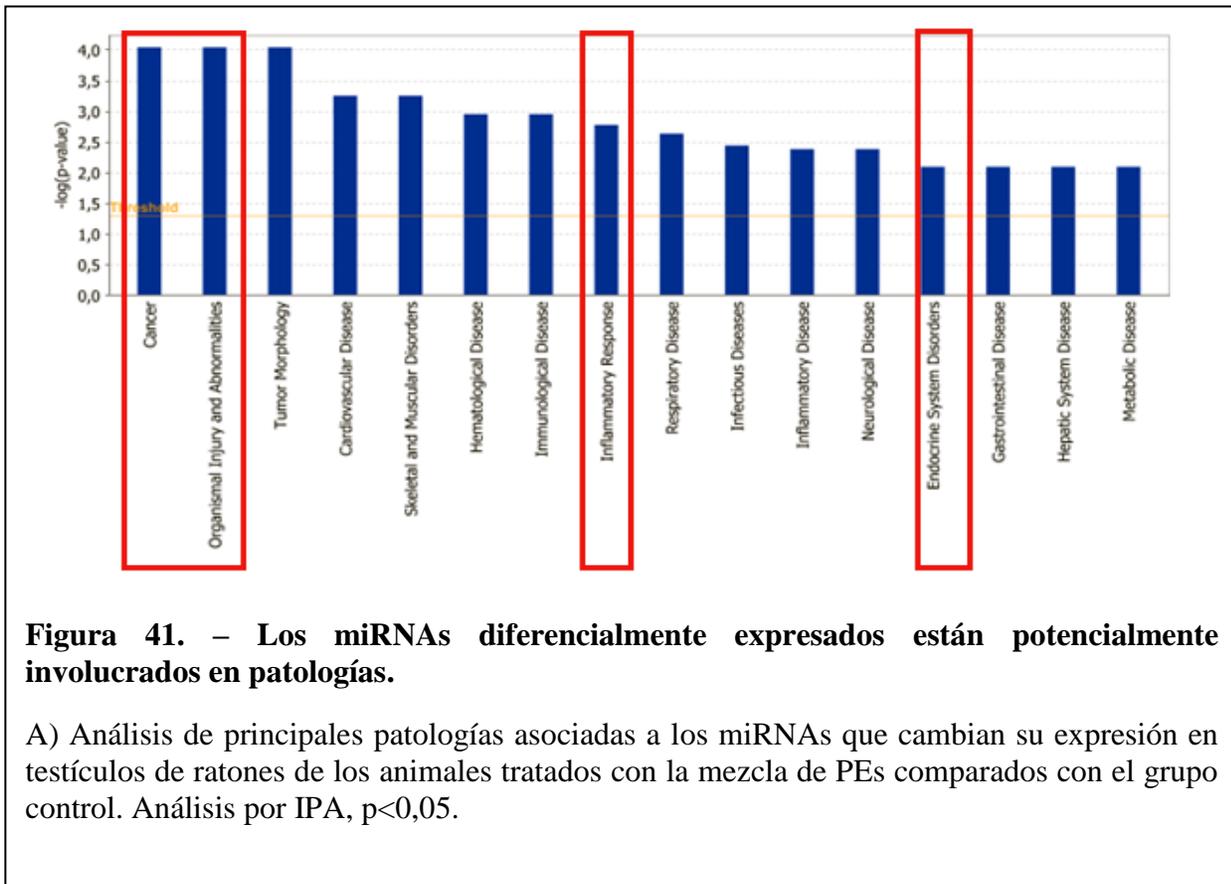


Figura 41. – Los miRNAs diferencialmente expresados están potencialmente involucrados en patologías.

A) Análisis de principales patologías asociadas a los miRNAs que cambian su expresión en testículos de ratones de los animales tratados con la mezcla de PEs comparados con el grupo control. Análisis por IPA, $p < 0,05$.

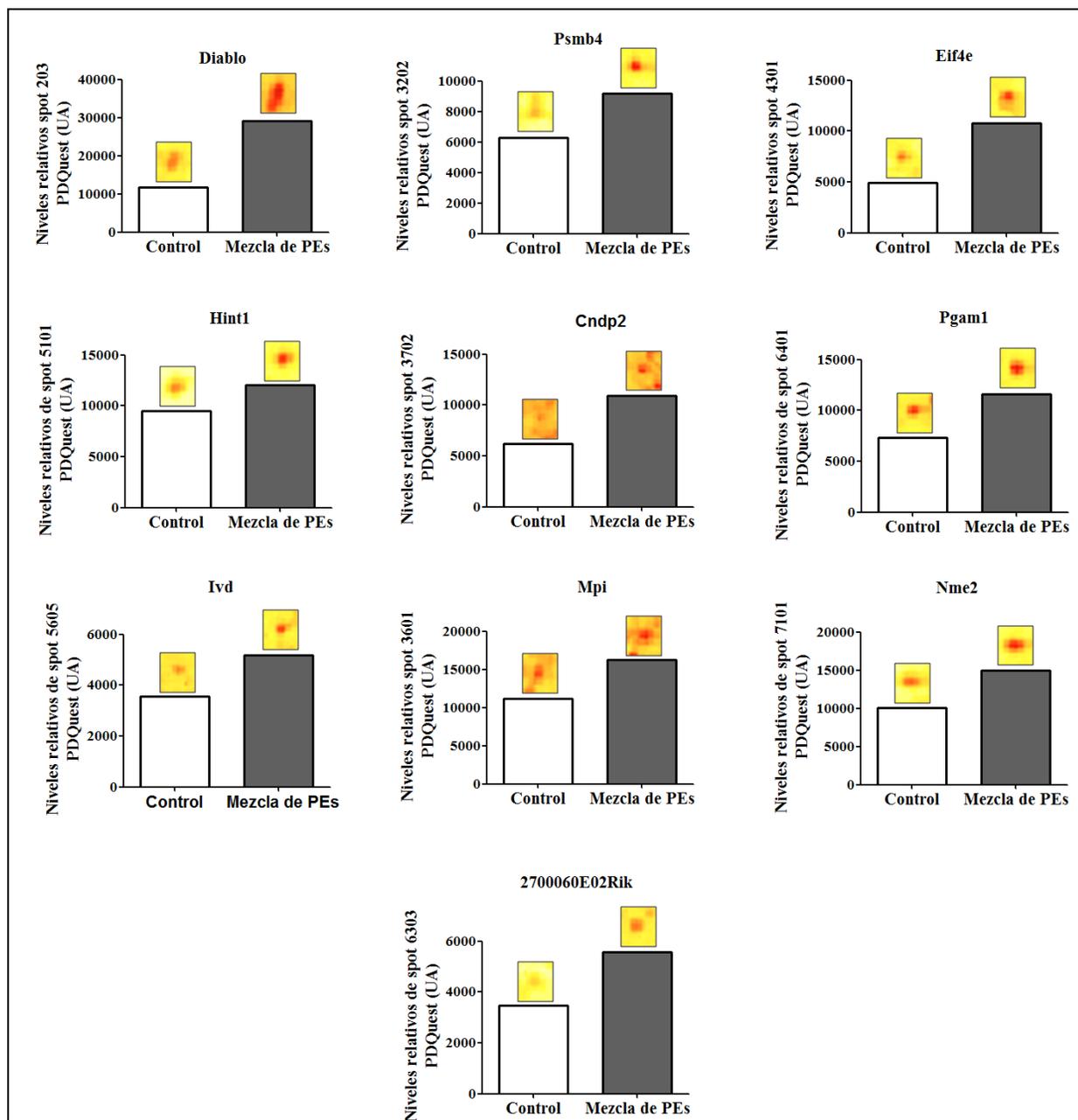
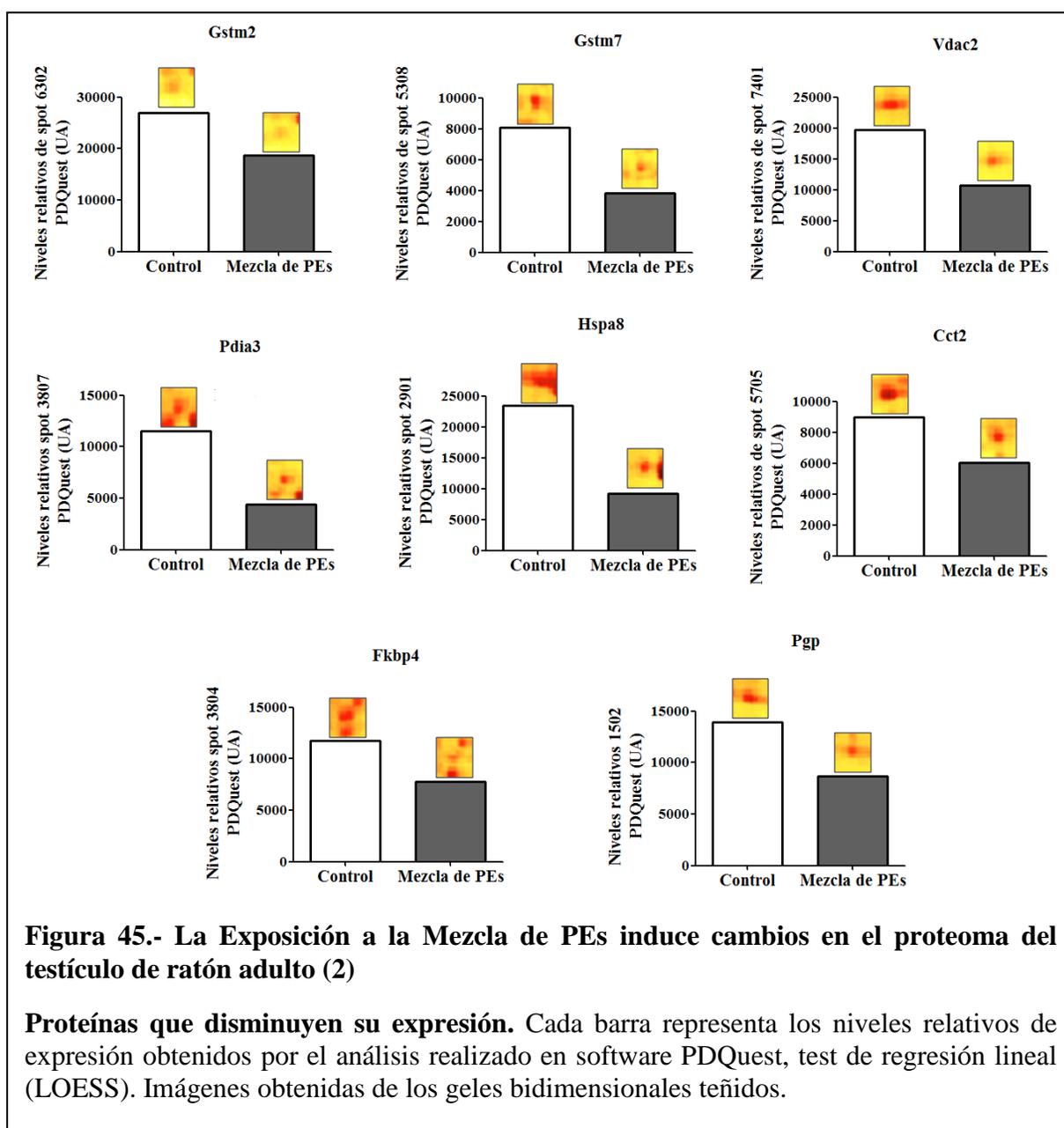


Figura 44.- La Exposición a la Mezcla de PEs induce cambios en el proteoma del testículo de ratón adulto (1).

Proteínas que aumentan su expresión. Cada barra representa los niveles relativos de expresión obtenidos por el análisis realizado en software PDQuest, test de regresión lineal (LOESS). Imágenes obtenidas de los geles bidimensionales teñidos.



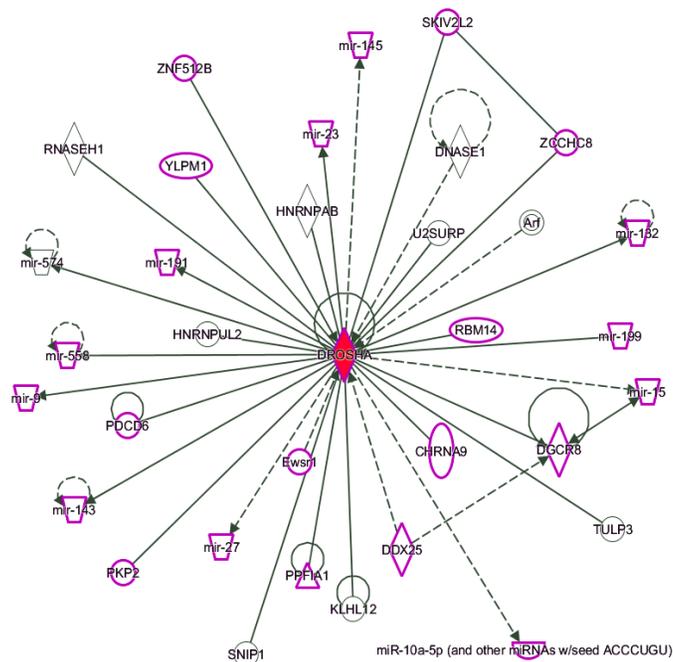


Figura 46.- Análisis de redes muestra la participación de la sobre-expresión de *Drosha* en la activación de proteínas o miRNAs implicados en enfermedades reproductivas.

Análisis por IPA, proteínas o miRNAs con color morado se señalan implicadas en patologías reproductivas en machos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abu-Halima, M., Backes, C., Leidinger, P., Keller, A., Lubbad, A. M., Hammadeh, M., Meese, E. (2014a).** MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertility and Sterility*, 101(1), 78-86. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.009>.
2. **Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Backes, C., Fischer, U., Leidinger, P., Lubbad, A. M., ... Meese, E. (2014b).** Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertility and Sterility*, 102(4), 989–997.e1. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.001>
3. **Abu-Halima, M., Hammadeh, M., & Schmitt, J. (2013).** Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1249–1255.e16. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.054>
4. **Amiridou, D., & Voutsas, D. (2011).** Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of Hazardous Materials*, 185(1), 281–286. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.031>
5. **Anders, S., McCarthy, D., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G., Huber, W., & Robinson, M. (2013).** Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature Protocols*, 8(9), 1765–1786. <http://doi.org/10.1038/nprot.2013.099>
6. **Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998).** Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305–1308. <http://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
7. **Baker, B. Y., Epand, R. F., Epand, R. M., & Miller, W. L. (2007).** Cholesterol binding does not predict activity of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10223–10232. <http://doi.org/10.1074/jbc.M611221200>

8. **Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., ... Einat, P. (2004).** MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Research*, *14*, 2486–2494. <http://doi.org/10.1101/gr.2845604>
9. **Bartel, D. P. (2009).** Review MicroRNAs : Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, *136*, 215–233. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
10. **Baskerville, S., & Bartel, D. P. (2005).** Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, *11*(3), 241–7. <http://doi.org/10.1261/rna.7240905>
11. **Basu, A., & Haldar, S. (1998).** The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular Human Reproduction*, *4*(12), 1099–1109. <http://doi.org/10.1093/molehr/4.12.1099>
12. **Beishline, K., & Azizkhan-Clifford, J. (2015).** Sp1 and the “hallmarks of cancer.” *FEBS Journal*. *282*(2), 224–258. <http://doi.org/10.1111/febs.13148>
13. **Benachour, N., Moslemi, S., Sipahutar, H., & Seralini, G. E. (2007).** Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *222*(2), 129–140. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2007.03.033>
14. **Benbrahim-Tallaa, L., Tabone, E., Tosser-Klopp, G., Hatey, F., & Benahmed, M. (2002).** Glutathione S-transferase alpha expressed in porcine Sertoli cells is under the control of follicle-stimulating hormone and testosterone. *Biology of Reproduction*, *66*(6), 1734–1742.
15. **Bergé, A., Gasperi, J., Rocher, V., Gras, L., Coursimault, A., & Moilleron, R. (2014).** Phthalates and alkylphenols in industrial and domestic effluents: Case of Paris conurbation (France). *Science of the Total Environment*, *488-489*(1), 26–35. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.081>

16. **Bindea, G., Galon, J., & Mlecnik, B. (2013).** CluePedia Cytoscape plugin: Pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics*, 29(5), 661–663. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt019>
17. **Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., ... Galon, J. (2009).** ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8), 1091–1093. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
18. **Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., ... Fearon, E. R. (2007).** p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Current Biology*, 17(15), 1298–1307. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.068>
19. **Bonache, S., Algaba, F., Franco, E., Bassas, L., Larriba, S. (2014).** Altered gene expression signature of early stages of the germ line supports the pre-meiotic origin of human spermatogenic failure. *Andrology*, 2(4), 596–606. <http://doi:10.1111/j.2047-2927.2014.00217.x>.
20. **Borday, C., Merlet, J., Racine, C., Haber, R. (2013).** Expression and localization of aromatase during fetal mouse testis development. *Basic and Clinical Andrology*, 23(12). <http://doi:10.1186/2051-4190-23-12>
21. **Bose, M., Whittal, R. M., Miller, W. L., & Bose, H. S. (2008).** Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 8837–8845. <http://doi.org/10.1074/jbc.M709221200>
22. **Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
23. **Braw-Tal, R. (2010).** Endocrine disruptors and timing of human exposure. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 8, 41–46.
24. **Briño-Enríquez, M. A., García-López, J., Cárdenas, D. B., Guibert, S., Cleroux, E., Déd, L., Hourcade, J. de D., Pěkníková, J., Weber, M., del Mazo, J. (2015).** Exposure

to endocrine disruptor induces transgenerational epigenetic deregulation of microRNAs in primordial germ cells. *PLoS ONE*, 10(4), e0124296. [http://doi:10.1371/journal.pone.0124296](http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124296).

25. **Buchold, G. M., Coarfa, C., Kim, J., Milosavljevic, A., Gunaratne, P. H., & Matzuk, M. M. (2010).** Analysis of MicroRNA Expression in the Prepubertal Testis. *PLoS ONE*, 5(12): e15317. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015317>

26. **Bustamante-Marín, X., Quiroga, C., Lavandero, S., Reyes, J. G., & Moreno, R. D. (2012).** Apoptosis, necrosis and autophagy are influenced by metabolic energy sources in cultured rat spermatocytes. *Apoptosis*, 17(6), 539–550. <http://doi.org/10.1007/s10495-012-0709-2>

27. **Carani, C., Fabbi, M., Zirilli, L., & Sgarbi, I. (2002).** Estrogen resistance and aromatase deficiency in humans. *Journal De La Societe De Biologie*, 196, 245–248.

28. **Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., & Bourguiba, S. (2003).** Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1 (35), 1-6 <http://doi.org/10.1186/1477-7827-1-35>

29. **Chan, MC., Mather, JP., McCray, G., Lee, WM. (2011).** Identification and regulation of receptor tyrosine kinases Rse and Mer and their ligand Gas6 in testicular somatic cells. *Journal of Andrology*, 21 (2): 291–302.

30. **Charles, G. D., Gennings, C., Tornesi, B., Kan, H. L., Zacharewski, T. R., Bhaskar Gollapudi, B., & Carney, E. W. (2007).** Analysis of the interaction of phytoestrogens and synthetic chemicals: An in vitro/in vivo comparison. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(3), 280–288. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.029>

31. **Chawla, G., & Sokol, N. S. (2014).** ADAR mediates differential expression of polycistronic microRNAs. *Nucleic Acids Research*, 42(8), 5245–5255. <http://doi.org/10.1093/nar/gku145>

32. **Chédin, F. (2011).** The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 101: 255–85; [http://doi: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00007-X](http://doi.org/10.1016/B978-0-12-387685-0.00007-X).
33. **Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., ... Guegler, K. J. (2005).** Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), e179. <http://doi.org/10.1093/nar/gni178>
34. **Chen, Q.-R., Yu, L.-R., Tsang, P., Wei, J. S., Song, Y. K., Cheuk, A., ... Khan, J. (2011).** Systematic proteome analysis identifies transcription factor YY1 as a direct target of miR-34a. *Journal of Proteome Research*, 10(2), 479–487. <http://doi.org/10.1021/pr1006697>
35. **Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., ... & Browning, J. L. (1997).** TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32401–32410. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32401>
36. **Cho, S. G., Lee, Y. H., Park, H. S., Ryoo, K., Kang, K. W., Park, J., ...& Choi, E. J. (2001).** Glutathione S-Transferase Mu Modulates the Stress-activated Signals by Suppressing Apoptosis Signal-regulating Kinase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12749–12755. <http://doi.org/10.1074/jbc.M005561200>
37. **Choe, J., Cho, H., Chi, S. G., & Kim, Y. K. (2011).** Ago2/miRISC-mediated inhibition of CBP80/20-dependent translation and thereby abrogation of nonsense-mediated mRNA decay require the cap-associating activity of Ago2. *FEBS Letters*, 585(17), 2682–2687. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.07.047>
38. **Choi, J.-S., Oh, J.-H., Park, H.-J., Choi, M.-S., Park, S.-M., Kang, S.-J., ... Yoon, S. (2011).** miRNA regulation of cytotoxic effects in mouse Sertoli cells exposed to nonylphenol. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(126). <http://doi.org/10.1186/1477-7827-9-126>
39. **Clark, B. J., & Cochrum, R. K. (2007).** The steroidogenic acute regulatory protein as a target of endocrine disruption in male reproduction. *Drug Metabolism Reviews*, 39(2-3), 353–370. <http://doi.org/10.1080/03602530701519151>

40. **Clark, B. J., & Stocco, D. M. (1996).** StAR-A tissue specific acute mediator of steroidogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 7, 227–233.
41. **Cloonan, N., Wani, S., Xu, Q., Gu, J., Lea, K., Heater, S., ... Grimmond, S. M. (2011).** MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biology*, 12(12), R126. <http://doi.org/10.1186/gb-2011-12-12-r126>
42. **Colecchia, M., Nistal, M., Gonzalez-Peramato, P., Carmignani, L., Salvioni, R., Nicolai, N., & Regadera, J. (2007).** Leydig cell tumor and hyperplasia: A review. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 29(3): 139–147.
43. **Comazzetto, S., Di Giacomo, M., Rasmussen, K. D., Much, C., Azzi, C., Perlas, E., ... O'Carroll, D. (2014).** Oligoasthenoteratozoospermia and Infertility in Mice Deficient for miR-34b/c and miR-449 Loci. *PLoS Genetics*, 10(10), e1004597. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004597>
44. **Concepcion, C. P., Bonetti, C., & Ventura, A. (2012).** The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer Journal*, 18(3), 262–267. <http://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318258b60a>
45. **Cory, S., & Adams, J. M. (2002).** The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647–656. <http://doi.org/10.1038/nrc883>
46. **Crowe, N., Swingler, T. E., Le, L. T. T., Barter, M. J., Wheeler, G., Pais, H., ... Clark, I. M. (2015).** Detecting new microRNAs in human osteoarthritic chondrocytes identifies miR-3085 as a human, chondrocyte-selective, microRNA. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(3): 534-543. <http://doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.002>
47. **Coureuil, M., Fouchet, P., Letaltec, B., Barroca, V., Racine, C., Allemand, I. (2006).** caspase-independent death of meiotic and postmeiotic cells overexpressing p53: Calpain involvement. *Cell Death Differentiation*, 13(11), 1927–1937. <http://doi.10.1038/sj.cdd.4401887>
48. **Cutting, A. D., Bannister, S. C., Doran, T. J., Sinclair, A. H., Tizard, M. V. L., & Smith, C. A. (2012).** The potential role of microRNAs in regulating gonadal sex differentiation in the chicken embryo. *Chromosome Research an International Journal on*

the Molecular Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology, 20(1), 201–213. <http://doi.org/10.1007/s10577-011-9263-y>

49. **Dalgard, C. L., Gonzalez, M., de Niro, J. E., & O'Brien, J. M. (2009).** Differential microRNA-34a expression and tumor suppressor function in retinoblastoma cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(10), 4542–4551. <http://doi.org/10.1167/iovs.09-3520>
50. **Dang, V. H., Choi, K.-C., Hyun, S.-H., & Jeung, E.-B. (2007).** Analysis of gene expression profiles in the offspring of rats following maternal exposure to xenoestrogens. *Reproductive Toxicology*, 23, 42–54. <http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.08.010>
51. **De Benedetti, A., & Graff, J. R. (2004).** eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*, 23(18), 3189–3199. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207545>
52. **De Jager, C., Bornman, M. S., & Van Der Horst, G. (1999).** The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. *Andrologia*, 31(2), 99–106. <http://doi.org/10.1046/j.1439-0272.1999.00245.x>
53. **Delbès, G., Levacher, C., & Habert, R. (2006).** Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*, 132(4), 527–538. <http://doi.org/10.1530/rep.1.01231>
54. **Dodson, R. E., Nishioka, M., Standley, L. J., Perovich, L. J., Brody, J. G., & Rudel, R. A. (2012).** Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environmental Health Perspectives*, 120(7): 935–943. <http://doi.org/10.1289/ehp.1104052>
55. **Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000).** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33–42. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00008-8](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00008-8)
56. **Duana, P., Hub, C., Butler, H.J., Quana, C., Chena, W., ... Martinc, K. Y. (2016).** Effects of 4-nonylphenol on spermatogenesis and induction of testicular apoptosis through oxidative stress-related pathways. *Reproductive Toxicology*, 62, 27–38. <http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.016>

57. **EU (European Commission). (2008).** BIS (2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE (DEHP) CAS No: 117-81-7 EINECS No: 204-211-0 SUMMARY RISK ASSESSMENT REPORT.
58. **Dweep, H., Gretz, N., & Sticht, C. (2014).** miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods in Molecular Biology*, *1182*, 289–305. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1062-5_25
59. **Elmore, S. (2007).** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <http://doi.org/10.1080/01926230701320337>
60. **Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998).** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, *391*(6662), 43–50. <http://doi.org/10.1038/34112>
61. **Erkekoglu, P., Rachidi, W., Yuzugullu, O. G., Giray, B., Favier, A., Ozturk, M., & Hincal, F. (2010).** Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylHexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylHexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *248*(1), 52–62. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.016>
62. **Fang, H., Tong, W., Branham, W. S., Moland, C. L., Dial, S. L., Hong, H., ... Sheehan, D. M. (2003).** Study of 202 Natural, Synthetic, and Environmental Chemicals for Binding to the Androgen Receptor. *Chemical Research in Toxicology*, *16*(10), 1338–1358. <http://doi.org/10.1021/tx030011g>
63. **Faniband, M., Lindh, C. H., & Jönsson, B. A. (2014).** Human biological monitoring of suspected endocrine-disrupting compounds. *Asian Journal of Andrology*, *16*(1), 5–16. <http://doi.org/10.4103/1008-682X.122197>
64. **Fasano, E., Bono-Blay, F., Cirillo, T., Montuori, P., & Lacorte, S. (2012).** Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylHexyl)adipate from food packaging. *Food Control*, *27*(1), 132–138. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.005>
65. **FDA (U.S. Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health). (2001).** Safety Assessment of Di(2-ethylHexyl)phthalate (DEHP) Released

from PVC Medical Devices.
<http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/.../UCM080457.pdf>

66. **Feng, Y., Zhang, X., Graves, P., & Zeng, Y. (2012).** A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA*, *18*(2005), 2083–2092. <http://doi.org/10.1261/rna.033688.112>
67. **Fisher, C. R., Graves, K. H., Parlow, A. F., & Simpson, E. R. (1998).** Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*, 6965–6970.
68. **Fisher, J. S., Turner, K. J., Brown, D., & Sharpe, R. M. (1999).** Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environmental Health Perspectives*, *107*(5), 397–405. <http://doi.org/10.1289/ehp.99107397>
69. **Frederiksen, H., Skakkebaek, N. E., & Andersson, A. M. (2007).** Metabolism of phthalates in humans. *Molecular Nutrition Food Research*, *51*, 899–911.
70. **García-López, J., Briño-Enríquez, M. A., & del Mazo, J. (2013a).** MicroRNA biogenesis and variability. *Biomolecular Concepts*, *4* (4): 367–380. <http://doi.org/10.1515/bmc-2013-0015>
71. **García-López, J., & del Mazo, J. (2012).** Expression dynamics of microRNA biogenesis during preimplantation mouse development. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(8), 847–854. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.03.007>
72. **García-López, J., Hourcade, Jdel. D., & Del Mazo, J. (2013b).** Reprogramming of microRNAs by adenosine-to-inosine editing and the selective elimination of edited microRNA precursors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Nucleic Acids Research*, *41*(10), 5483–5493. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt247>
73. **Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006).** Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, *13*(9), 1423–1433. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>

74. **Gong, Y., & Han, X. D. (2006).** Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reproductive Toxicology*, 22(4), 623–630. <http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.04.019>
75. **González-González, E., López-Casas, P. P., & del Mazo, J. (2008).** The expression patterns of genes involved in the RNAi pathways are tissue-dependent and differ in the germ and somatic cells of mouse testis. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(5), 306–311. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.01.007>
76. **Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., ... Zoeller, R. T. (2015).** Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), 593–602. <http://doi.org/10.1210/er.2015-1093>
77. **Gray, L. E., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D. N., & Parks, L. (2000).** Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicological Sciences*, 58(2), 350–365. <http://doi.org/10.1093/toxsci/58.2.350>
78. **Greco, T. L., & Payne, A. H. (1994).** Ontogeny of Expression of the Genes for Steroidogenic Enzymes P450 Side-Chain Cleavage, 3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase, P450 17-Alpha-Hydroxylase C-17-20 Lyase, and P450 Aromatase in Fetal Mouse Gonads. *Endocrinology*, 135(1), 262–268.
79. **Gregory, M., Lacroix, A., Haddad, S., Devine, P., Charbonneau, M., Tardif, R., ... Cyr, D. G. (2009).** Effects of chronic exposure to octylphenol on the male rat reproductive system. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 72(23), 1553–1560. <http://doi.org/10.1080/15287390903232434>
80. **Guil, S., & Cáceres, J. F. (2007).** The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(7), 591–596. <http://doi.org/10.1038/nsmb1250>
81. **Gulbins, E. (2003).** Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacological Research*, 47(5):393-9. [http://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00052-5](http://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00052-5)

82. **Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010).** Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, *466*(7308), 835–840. <http://doi.org/nature09267>
83. **Guo, L., & Chen, F. (2014).** A challenge for miRNA: Multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene*, *544*(1):1-7. <http://doi: 10.1016/j.gene.2014.04.039>
84. **Hasanbasic, I., Cuerquis, J., Varnum, B., & Blostein, M. D. (2004).** Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *287*(3), H1207–1213. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00020.2004>
85. **Habert, R., Muczynski, V., Grisin, T., Moison, D., Messiaen, S., Frydman, R., ... Livera, G. (2014).** Concerns about the widespread use of rodent models for human risk assessments of endocrine disruptors. *Reproduction*, *147*(4), R119-129. <http://doi.org/10.1530/REP-13-0497>
86. **Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., ... Tuschl, T. (2010).** Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell*, *141*(1), 129–141. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.009>
87. **Harris S, Hermsen SA, Yu X, Hong SW, F. E. (2015).** Comparison of toxicogenomic responses to phthalate ester exposure in an organotypic testis co-culture model and responses observed in vivo. *Reproductive Toxicology*, *58*, 149–159. <http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.10.002>
88. **Hauser, R., & Sokol, R. (2008).** Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertility and Sterility*, *89*(2 Suppl), e59-65. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.12.033>
89. **Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., ... Tsui, M. (2006).** Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives*, *114*(SUPPL.1), 40–50. <http://doi.org/10.1289/ehp.8051>
90. **He, J., Cheng, Q., & Xie, W. (2010).** Minireview: Nuclear receptor-controlled steroid hormone synthesis and metabolism. *Molecular Endocrinology*, *24*(1), 11–21.

<http://doi.org/10.1210/me.2009-0212>

91. **He, L., & Hannon, G. J. (2004).** MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics*, *5*(7), 522–531. <http://doi.org/10.1038/nrg1415>
92. **Heindel, J. J., Newbold, R., & Schug, T. T. (2015).** Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews. Endocrinology*, *11*(11), 653–61. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2015.163>
93. **Hirano, Y., Kaneko, T., Okamoto, K., Bai, M., Yashiroda, H., Furuyama, K., ... Murata, S. (2008).** Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *The EMBO Journal*, *27*(16), 2204–2213. <http://doi.org/10.1038/emboj.2008.148>
94. **Hossain, M. M., Soheli, M. M. H., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2012).** Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell and Tissue Research*, *349*(3), 679–90. <http://doi.org/10.1007/s00441-012-1469-6>
95. **Howdeshell, K. L., Wilson, V. S., Furr, J., Lambright, C. R., Rider, C. V., Blystone, C. R., ... Gray, L. E. (2008).** A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the Sprague-Dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicological Sciences*, *105*(1), 153–165. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfn077>
96. **Howdeshell, K. L., Rider, C. V., Wilson, V. S., & Gray, L. E. (2008).** Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environmental Research*, *108*(2), 168–176. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2008.08.009>
97. **Huang, J., Lyu, H., Wang, J., & Liu, B. (2015).** MicroRNA regulation and therapeutic targeting of survivin in cancer. *American Journal of Cancer Research*, *5*(1), 20–31.
98. **Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., ... Bustin, S. A. (2013).** The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clinical Chemistry*, *59*(6), 892–902. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375>
99. **Hurst, C. H., & Waxman, D. J. (2003).** Activation of PPAR-alpha and PPAR-gamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicological Sciences*, *74*(2), 297–308.

<http://doi.org/10.1093/toxsci/kfg145>

100. **Ichimura, T., Kawamura, M., & Mitani, A. (2003).** Co-localized expression of FasL, Fas, Caspase-3 and apoptotic DNA fragmentation in mouse testis after oral exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicology*, *194*(1-2), 35–42. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2003.07.003>
101. **ILO (I. labour organization). (1998).** Charter 33: Toxicology. *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety 4th Edition*.
102. **Irvine DS. (1998)** Epidemiology and aetiology of male infertility. *Human Reproduction*. *13*, 33-44
103. **Izzotti, Calin, G. a, Arrigo, P., Steele, V. E., Croce, C. M., & De Flora, S. (2009).** Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *The FASEB Journal*, *23*(3), 806–812. <http://doi.org/10.1096/fj.08-121384>
104. **Izzotti, A., & Pulliero, A. (2014).** The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *217*(6), 601-627. <http://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.01.001>
105. **Jambor, T., Lukáčová, J., Tvrďá, E., Kňazická, Z., Forgács, Z, L. N. (2016).** The Impact of 4-Nonylphenol on the Viability and Hormone Production of Mouse Leydig Cells. *Folia Biologica*, *62*, 34–39.
106. **Jansen, R. S., Addie, R., Merkx, R., Fish, A., Mahakena, S., Bleijerveld, O. B., ... van de Wetering, K. (2015).** N-lactoyl-amino acids are ubiquitous metabolites that originate from CNDP2-mediated reverse proteolysis of lactate and amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(21), 6601–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1424638112>
107. **Jarow, J. P., Chen, H., Rosner, T. W., Trentacoste, S., & Zirkin, B. R. (2001).** Assessment of the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. *Journal of Andrology*, *22*(4), 640–645.
108. **Johnson, K. J., Heger, N. E., & BoekeLHeide, K. (2012).** Of mice and men (and rats): Phthalate-induced fetal testis endocrine disruption is species-dependent. *Toxicological*

Sciences, 129(2), 235-248. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfs206>

109. **Jones S, Boisvert A, Francois S, Zhang L, C. M. (2015).** In utero exposure to di-(2-ethylHexyl) phthalate induces testicular effects in neonatal rats that are antagonized by genistein cotreatment. *Biology of Reproduction*, 93(4), 1–14. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.115.129098>.
110. **Joza, N., Susin, S. a, Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., ... Penninger, J. M. (2001).** Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549–554. <http://doi.org/10.1038/35069004>
111. **Kasahara, E., Sato, E. F., Miyoshi, M., Konaka, R., Hiramoto, K., Sasaki, J., ... Inoue, M. (2002).** Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylHexyl)phthalate. *The Biochemical Journal*, 365, 849–856. <http://doi.org/10.1042/BJ20020254>
112. **Kerr, J. F., Wyllie, H., & Currie, A. R. (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–247. <http://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
113. **Kim, B., Ha, M., Loeff, L., Chang, H., Simanshu, D. K., Li, S., ... Kim, V. N. (2015).** TUT7 controls the fate of precursor microRNAs by using three different uridylation mechanisms. *The EMBO Journal*, 34(13), 1801–15. <http://doi.org/10.15252/embj.201590931>
114. **Kobayashi, T., Niimi, S., Kawanishi, T., Fukuoka, M., Hayakawa, T. (2003).** Changes in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate. *Toxicology Letters*, 138(3), 215–225. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00414-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00414-9)
115. **Kortenkamp, A. (2014).** Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Current Opinion in Pharmacology*, 19, 105–111. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2014.08.006>
116. **Kowalewski, MP., Dyson, MT., Manna, PR., Stocco, D. M. (2009).** Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in gonadal steroidogenesis and

steroidogenic acute regulatory protein expression. *Reproductive Fertility and Development*, 21(7), 909–922. <http://doi.org/10.1071/RD09027>

117. **Kozomara, A., Griffiths-Jones, S. (2014).** MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42, D68–D73. <http://doi.org.10.1093/nar/gkt1181>.
118. **Krämer, A., Green, J., Pollard, J., & Tugendreich, S. (2014).** Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*, 30(4), 523–530. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt703>
119. **Kranvogel, R., Knez, J., Miuc, A., Vončina, E., Vončina, D. B., & Vlaisavljević, V. (2014).** Simultaneous determination of phthalates, their metabolites, alkylphenols and bisphenol a using GC-MS in urine of men with fertility problems. *Acta Chimica Slovenica*, 61(1), 110–120.
120. **Lagos-Cabre, R., & Moreno, RD. (2012).** Contribution of environmental pollutants to male infertility: A working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biological Research*, 45, 1–10. <http://doi: 10.4067/S0716-97602012000100001>
121. **Lardone, M. C., Piottante, A., Valdevenito, R., Ebensperger, M., & Castro, A. (2013).** Histological and hormonal testicular function in oligo/azoospermic infertile men. *Andrologia*, 45(6), 379–385. <http://doi.org/10.1111/and.12026>
122. **Larriba, E., & del Mazo J. (2016).** Role of Non-Coding RNAs in the Transgenerational Epigenetic Transmission of the Effects of Reprotoxicants. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4),452. <http://doi: 10.3390/ijms17040452>
123. **Larsson, D. A., Baird, S., Nyhalah, J. D., Yuan, X. M., & Li, W. (2006).** Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(6), 902–910. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.032>
124. **Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., ... Kim, V. N. (2003).** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <http://doi.org/10.1038/nature01957>

125. **Lehmann, K. P., Phillips, S., Sar, M., Foster, P. M. D., & Gaido, K. W. (2004).** Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicological Sciences*, *81*(1), 60–68. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfh169>
126. **Leidinger P, Brefort T, Backes C, Krapp M, Galata V, Beier M, KohlHaas J, Huwer H, Meese E, K. A. (2015).** High-throughput qRT-PCR validation of blood microRNAs in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, *7*(4), 4611–4623.
127. **Li, X., Mäkelä, S., Streng, T., Santti, R., & Poutanen, M. (2003).** Phenotype characteristics of transgenic male mice expressing human aromatase under ubiquitin C promoter. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *86*, 469–476. [http://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00376-5](http://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00376-5)
128. **Li, X., Strauss, L., Kaatrasalo, A., Mayerhofer, A., Huhtaniemi, I., Santti, R., ... Poutanen, M. (2006).** Transgenic mice expressing p450 aromatase as a model for male infertility associated with chronic inflammation in the testis. *Endocrinology*, *147*(3), 1271–1277. <http://doi.org/10.1210/en.2005-0654>
129. **Liang, X., Zhou, D., Wei, C., Luo, H., Liu, J., Fu, R., & Cui, S. (2012).** MicroRNA-34c enhances murine male germ cell apoptosis through targeting ATF1. *PLoS ONE*, *7*(3), e33861. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0033861>
130. **Linsen, S. E. V, de Wit, E., de Bruijn, E., & Cuppen, E. (2010).** Small RNA expression and strain specificity in the rat. *BMC Genomics*, *11*(249). <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-249>
131. **Liu, J. (2008).** Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Current Opinion in Cell Biology*, *20*, 214–221. <http://doi: 10.1016/j.ceb.2008.01.006>
132. **Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
133. **Lizama, C., Lagos, C. F., Lagos-Cabré, R., Cantuarias, L., Rivera, F., Moreno, R. D. (2009).** Calpain inhibitors prevent p38 MAPK activation and germ cell apoptosis after

heat stress in pubertal rat testes. *Journal of Cell Physiology*, 221(2),296-305. <http://doi:10.1002/jcp.21868>

134. **Llorens, F., Bañez-Coronel, M., Pantano, L., del Río, J. A., Ferrer, I., Estivill, X., & Martí, E. (2013).** A highly expressed miR-101 isomiR is a functional silencing small RNA. *BMC Genomics*, 14, 104. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-104>
135. **López-Casas, P. P., Mizrak, S. C., López-Fernández, L. A., Paz, M., De Rooij, D. G., & del Mazo, J. (2012).** The effects of different endocrine disruptors defining compound-specific alterations of gene expression profiles in the developing testis. *Reproductive Toxicology*, 33(1), 106–115. <http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.12.012>
136. **Loveland, KL., Bakker, M., Meehan, T., Christy, E., Drummond, A., De Kretser, D. (2003).** Expression of Bambi is widespread in juvenile and adult rat tissues and is regulated in male germ cells. *Endocrinology*, 144(9), 4180–4186. <http://doi.org/10.1210/en.2002-0124>
137. **Luo H, Guo W, Wang F, You Y, Wang J, Chen X, Wang J, Wang Y, Du Y, Chen X, Xue C, Song G, W. F. (2015).** miR-1291 targets mucin 1 inhibiting cell proliferation and invasion to promote cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 34, 2665–2673. <http://doi.org/10.3892/or.2015.4206>
138. **Maeda, N., Okumura, K., Tanaka, E., Suzuki, T., Miyasho, T., Haeno, S., ... Yokota, H. (2014).** Downregulation of cytochrome P450scc as an initial adverse effect of adult exposure to diethylstilbestrol on testicular steroidogenesis. *Environmental Toxicology*, 29(12), 1452–1459. <http://doi.org/10.1002/tox.21875>
139. **Maqdasy, S., El Hajjaji, F. Z., Baptissart, M., Viennois, E., Oumeddour, A., Brugnon, F., ... Baron, S. (2015).** Identification of the functions of liver X receptor in Sertoli cells using a targeted expression-rescue model. *Endocrinology*, 156(12), 4545–4557. <http://doi.org/10.1210/en.2015-1382>
140. **Marco, A., Ninova, M., Ronshaugen, M., & Griffiths-Jones, S. (2013).** Clusters of microRNAs emerge by new hairpins in existing transcripts. *Nucleic Acids Research*, 41(16), 7745–7752. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt534>
141. **Martin, M. (2011).** Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10. <http://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

142. **Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V, Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., ... Sonenberg, N. (2007).** MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, *317*, 1764–1767. <http://doi.10.1126/science.114606>
143. **Mattick, J. S., & Mehler, M. F. (2008).** RNA editing, DNA recoding and the evolution of human cognition. *Trends in Neurosciences*, *31*(5), 227–233. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2008.02.003>
144. **McKinlay, R., Plant, J. A., Bell, J. N. B., & Voulvoulis, N. (2008).** Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environment International*, *34*(2), 168–183. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2007.07.013>
145. **Menale, C., Piccolo, M. T., Cirillo, G., Calogero, R. A., Papparella, A., Mita, L., ... Mita, D. G. (2015).** Bisphenol A effects on gene expression in children adipocytes: association to metabolic disorders. *Journal of Molecular Endocrinology*, *54*(3), 289–303. <http://doi.org/10.1530/JME-14-0282>
146. **Meruvu, S., Zhang, J., Bedi, Y. S., & Choudhury, M. (2016).** Mono-(2-ethylHexyl) phthalate induces apoptosis through miR-16 in human first trimester placental cell line HTR-8/SVneo. *Toxicology in Vitro*, *31*, 35–42. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.010>
147. **Michlewski, G., Guil, S., & Caceres, J. F. (2010).** Stimulation of pri-miR-18a processing by hnRNPA1. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *700*, 28–35. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7823-3_3
148. **Miller, W. L. (1995).** Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *55*(5-6), 607–616. [http://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00212-X](http://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00212-X)
149. **Moreno, R. D., Lizama, C., Urzúa, N., Vergara, S. P., & Reyes, J. G. (2006).** Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat. *Cell and Tissue Research*, *325*(3), 533–540. <http://doi.org/10.1007/s00441-006-0186-4>
150. **Moreno, R. D., Urriola-Munoz, P., & Lagos-Cabre, R. (2011).** The emerging role of matrix metalloproteases of the ADAM family in male germ cell apoptosis.

Spermatogenesis, 1(3), 195–208. <http://doi.org/10.4161/spmg.1.3.17894>

151. **Morishima, A., Grumbach, M. M., Simpson, E. R., Fisher, C., & Qin, K. (1995).** Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 12, 3689–3698. <http://doi.101210jcem.80.12.8530621>
152. **Motohashi M, Wempe MF, Mutou T, Takahashi H, Kansaku N, Ikegami M, Inomata T, Asari M, W. S. (2016).** Male rats exposed in utero to di(n-butyl) phthalate: Age-related changes in Leydig cell smooth endoplasmic reticulum and testicular testosterone-biosynthesis enzymes/proteins. *Reproductive Toxicology*, 59 (139-146).
153. **Mouzat, K., Volat, F., Baron, S., Alves, G., Pommier, A. J. C., Volle, D. H., ... Lobaccaro, J. M. A. (2009).** Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *Endocrinology*, 150(7), 3369–3375. <http://doi.org/10.1210/en.2008-1519>
154. **Mudduluru, G., Ceppi, P., Kumarswamy, R., Scagliotti, G. V, Papotti, M., & Allgayer, H. (2011).** Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer. *Oncogene*, 30(25), 2888–2899. <http://doi.org/10.1038/onc.2011.13>
155. **Muller, H., Marzi, M. J., & Nicassio, F. (2014).** IsomiRage: From Functional Classification to Differential Expression of miRNA Isoforms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2(38). <http://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00038>
156. **Muralidhar, B., Winder, D., Murray, M., Palmer, R., Barbosa-Morais, N., Saini, H., ... Coleman, N. (2011).** Functional evidence that Drosha overexpression in cervical squamous cell carcinoma affects cell phenotype and microRNA profiles. *Journal of Pathology*, 224(4), 496–507. <http://doi.org/10.1002/path.2898>
157. **Murata, Y., Robertson, K. M., Jones, M. E. E., & Simpson, E. R. (2002).** Effect of estrogen deficiency in the male: The ArKO mouse model. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193, 7–12. [http://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00090-4](http://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00090-4)
158. **Musi, N., & Guardado-Mendoza, R. (2014).** Adipose Tissue as an Endocrine Organ. In *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, 229–237. <http://doi.org/10.1016/B978-0->

12-408134-5.00014-7

159. **Naciff, J. M., Hess, K. A., Overmann, G. J., Torontali, S. M., Carr, G. J., Tiesman, J. P., ... Daston, G. P. (2005).** Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17 α -ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A. *Toxicological Sciences*, 86(2), 396–416. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfi198>
160. **Naughton, C. K., Nadler, R. B., Basler, J. W., & Humphrey, P. A. (1998).** Leydig Cell Hyperplasia. *British Journal of Urology*, 81, 282–289.
161. **Neilsen, C. T., Goodall, G. J., & Bracken, C. P. (2012).** IsomiRs - The overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends in Genetics*, 28(11), 544-549. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2012.07.005>
162. **Nohynek, G. J., Borgert, C. J., Dietrich, D., & Rozman, K. K. (2013).** Endocrine disruption: Fact or urban legend? *Toxicology Letters*, 223(3), 295–305. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.022>
163. **Ortiz-Zarragoitia, M., & Cajaraville, M. P. (2005).** Effects of selected xenoestrogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology: CBP*, 141(2), 133–144. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2005.05.010>
164. **Ota, H., Sakurai, M., Gupta, R., Valente, L., Wulff, B. E., Ariyoshi, K., ... Nishikura, K. (2013).** ADAR1 forms a complex with dicer to promote MicroRNA processing and RNA-induced gene silencing. *Cell*, 153(3), 575–589. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.024>
165. **Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., ... Kim, V. N. (2011).** Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475(7355), 201–205. <http://doi.org/10.1038/nature10198>
166. **Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004).** Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25(6), 947-970. <http://doi.org/10.1210/er.2003-0030>

167. **Paz, M., Morín, M., & del Mazo, J. (2006).** Proteome profile changes during mouse testis development. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics*, *1*(4), 404–15. <http://doi.org/10.1016/j.cbd.2006.10.002>
168. **Peng, D., Hub, C., Butler H. J., Quana C., Chena, W., Huang, W., ... Martinc, K. Y. (2016).** Effects of 4-nonylphenol on spermatogenesis and induction of testicular apoptosis through oxidative stress-related pathways. *Reproductive Toxicology*, *62* (27-38).
169. **Peter, M. E., & Krammer, P. H. (1998).** Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Current Opinion in Immunology*, *10*(5), 545-551. [http://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80222-7](http://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80222-7)
170. **Pigazzi, M., Manara, E., Baron, E., & Basso, G. (2009).** MiR-34b targets cyclic AMP-responsive element binding protein in acute myeloid leukemia. *Cancer Research*, *69*(6), 2471–2478. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3404>
171. **Pires-daSilva, A., Nayernia, K., Engel, W., Torres, M., Stoykova, A., ... Gruss, P. (2001).** Mice deficient for spermatid perinuclear RNA-binding protein show neurologic, spermatogenic, and sperm morphological abnormalities. *Developmental Biology*, *233* (2), 319–328. <http://doi.101006/bio.2001.0169>
172. **Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, J. E., Lapierre, R. J., Pothoulakis, C., Hagan, J. P., ... Gregory, R. I. (2011).** Lin28A and Lin28B inhibit let-7 MicroRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*, *147*(5), 1066–1079. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.039>
173. **Ptushkina, M., Malys, N., & McCarthy, J. E. G. (2004).** eIF4E isoform 2 in *Schizosaccharomyces pombe* is a novel stress-response factor. *EMBO Reports*, *5*(3), 311–316. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400088>
174. **Qian, Y., Liu, S., Guan, Y., Pan, H., Guan, X., ... Li, D. (2013).** Lgr4-mediated Wnt/ β -Catenin signaling in peritubular myoid cells is essential for spermatogenesis. *Development*, *140*(8), 1751–1761; <http://doi:10.1242/dev.093641>.
175. **Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., ... Oren, M. (2007).** Transcriptional Activation of miR-34a Contributes to p53-

Mediated Apoptosis. *Molecular Cell*, 26(5), 731–743.
<http://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.017>

176. **Rice, G. I., Kasher, P. R., Forte, G. M., Mannion, N. M., Greenwood, S. M., Szykiewicz, M., ... Crow, Y. J. (2012).** Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nature Genetics*, 44(11), 1243–1248. <http://doi.org/10.1038/ng.2414>
177. **Rich, K. A., Kerr, J. B., de Kretser, D. M. (1979).** Evidence for Leydig cell dysfunction in rats with seminiferous tubule damage. *Molecular Cell Endocrinology*, 2, 123–135.
178. **Ro, S., Park, C., Sanders, K. M., McCarrey, J. R., & Yan, W. (2007).** Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental Biology*, 311(2), 592–602. [http://doi.org/S0012-1606\(07\)01345-0](http://doi.org/S0012-1606(07)01345-0)
179. **Robertson, K. M., O'Donnell, L., Jones, M. E., Meachem, S. J., Boon, W. C., Fisher, C. R., ... Simpson, E. R. (1999).** Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7986–7991. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7986>
180. **Rogers, R., Ouellet, G., Brown, C., Moyer, B., Rasoulpour, T., & Hixon, M. (2008).** Cross-talk between the Akt and NF-kappaB signaling pathways inhibits MEHP-induced germ cell apoptosis. *Toxicological Sciences*, 106(2), 497–508. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfn186>
181. **Rokavec, M., Li, H., Jiang, L., & Hermeking, H. (2014).** The p53/miR-34 axis in development and disease. *Journal of Molecular Cell Biology*, 6(3): 214-230. <http://doi.org/10.1093/jmcb/mju003>
182. **Rone, M. B., Fan, J., & Papadopoulos, V. (2009).** Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(7), 646–58. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.03.001>
183. **Rouiller-Fabre, V., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Muczynski, V., Moison, D., Tourpin, S., ... Livera, G. (2015).** Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal

and neonatal testes: A gapped landscape. *Frontiers in Endocrinology*, 6 (58). <http://doi.org/10.3389/fendo.2015.00058>

184. **Russell, LD., Ettlín, R., Sinha-Hikim, AP., Clegg, ED. (1990).** Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwaters, Florida. ISBN 0-9627422-0-1.
185. **Ryazansky, S. S., Gvozdev, V. A., & Berezikov, E. (2011).** Evidence for post-transcriptional regulation of clustered microRNAs in *Drosophila*. *BMC Genomics*, 12(371). <http://doi.org/10.1186/1471-2164-12-371>
186. **Scadden, A. D. (2005).** The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(6), 489–496. <http://doi.org/10.1038/nsmb936>
187. **Schmidt, M.-J., West, S., & Norbury, C. J. (2011).** The human cytoplasmic RNA terminal U-transferase ZCCHC11 targets histone mRNAs for degradation. *RNA*, 17(1), 39–44. <http://doi.org/10.1261/rna.2252511>
188. **Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <http://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
189. **Sedha, S., Kumar, S., & Shukla, S. (2015).** Role of oxidative stress in male reproductive dysfunctions with reference to phthalate compounds. *Urology Journal*, 12(5), 2304–2316.
190. **Sekaran, S., & Jagadeesan, A. (2015).** In utero exposure to phthalate downregulates critical genes in Leydig cells of F1 male progeny. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(7), 1466–1477. <http://doi.org/10.1002/jcb.25108>
191. **Shen, W. J., Zaidi, S. K., Patel, S., Cortez, Y., Ueno, M., ... Kraemer, F. B. (2012).** Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis. *Endocrinology*, 153(7), 3249–3257. <http://doi:10.1210/en.2012-1048>.
192. **Shih, M. C., Chiu, Y. N., Hu, M. C., Guo, I. C., & Chung, B. C. (2011).** Regulation of steroid production: Analysis of Cyp11a1 promoter. *Molecular and Cellular*

Endocrinology, 336(1-2), 80-84. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2010.12.017>

193. **Sicinski, P., Donaher, J.L., Geng, Y., Parker, S.B., Gardner, H., ...Weinberg, R.A. (1996).** Cyclin D2 Is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*, 384, 470-474. <http://doi.101038/38447a0>
194. **Siddiqui, N., & Sonenberg, N. (2015).** Signalling to eIF4E in cancer. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 763–72. <http://doi.org/10.1042/BST20150126>
195. **Simpson, E. R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W. C., Robertson, K., Britt, K., ... Jones, M. (2002).** AROMATASE—A BRIEF OVERVIEW. *Annual Reviews Physiology*, 64, 93–127. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081601.142703>
196. **Singh, S., & Li, S. L. (2012).** Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 10143-10153. <http://doi.org/10.3390/ijms130810143>
197. **Siu, M. K., Mruk, D. D., Lee, W. M., Cheng, C. Y. (2003).** Adhering junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of 1-Integrin and focal adhesion complex-associated proteins. *Endocrinology* 144 (5), 2141–2163. <http://doi.101210/en.2002-22-221035>
198. **Smorag, L., Zheng, Y., Nolte, J., Zechner, U., Engel, W., & Pantakani, D. V. (2012).** MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: Evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203 and -34b-5p mediated spermatogenesis regulation. *Biology of the Cell*, 104(11), 677–692. <http://doi.org/10.1111/boc.201200014>
199. **Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., & Olea Serrano, F. (1995).** The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103, 113–122. <http://doi.org/10.1289/ehp.95103s7113>
200. **Starega-Roslan, J., Witkos, T. M., Galka-Marciniak, P., & Krzyzosiak, W. J. (2015).** Sequence features of Drosha and Dicer cleavage sites affect the complexity of IsomiRs. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8110–8127. <http://doi.org/10.3390/ijms16048110>

201. **Stefanidou, M., Maravelias, C., & Spiliopoulou, C. (2009).** Human exposure to endocrine disruptors and breast milk. *Endocrine Metabolic Immune Disorders Drug Targets*, 9, 269–276. <http://doi.10.21714/18715009789044372>
202. **Stocco, D. M. (2007).** The Role of StAR in Leydig Cell Steroidogenesis. In *Contemporary Endocrinology, The Leydig Cell in Health and Disease*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. (149–155).
203. **Stocco, D. M., Wang, X., Jo, Y., & Manna, P. R. (2005).** Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Molecular Endocrinology*, 19(11), 2647–2659. <http://doi.org/10.1210/me.2004-0532>
204. **Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015).** MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*, 6(11), 8474–90. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.3523>
205. **Suliman, A., Lam, A., Datta, R., & Srivastava, R. K. (2001).** Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*, 20(17), 2122–2133. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1204282>
206. **Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009).** Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460(7254), 529–533. <http://doi.org/nature08199>
207. **Svechnikov, K., Izzo, G., Landreh, L., Weisser, J., & Söder, O. (2010).** Endocrine disruptors and Leydig cell function. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 1–10. <http://doi.org/10.1155/2010/684504>
208. **Svingen, T., Vinggaard, A. M. (2015).** The risk of chemical cocktail effects and how to deal with the issue. *Journal of Epidemiology Community Health*, 70(4), 322–323. <http://doi: 10.1136/jech-2015-206268>
209. **Svingen, T., Letting, H., Hadrup, N., & Vinggaard, A. M. (2015).** Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under

physiological and toxicological conditions. *PeerJ*, 24(3), e855. <http://doi.107717/peerj.855>

210. **Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., ... Hermeking, H. (2007).** Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G 1-arrest. *Cell Cycle*, 6(13), 1586–1593. <http://doi.org/10.4161/cc.6.13.4436>
211. **Telonis, A. G., Loher, P., Jing, Y., Londin, E., & Rigoutsos, I. (2015).** Beyond the one-locus-one-miRNA paradigm: microRNA isoforms enable deeper insights into breast cancer heterogeneity. *Nucleic Acids Research*, 43(19), gkv922. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv922>
212. **Thomas, M. P., Liu, X., Whangbo, J., McCrossan, G., Sanborn, K. B., Basar, E., ... Lieberman, J. (2015).** Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global mRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2. *Cell Reports*, 11(7), 1079–1089. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.026>
213. **Thornton, J. E., Du, P., Jing, L., Sjekloca, L., Lin, S., Grossi, E., ... Gregory, R. I. (2014).** Selective microRNA uridylation by Zcchc6 (TUT7) and Zcchc11 (TUT4). *Nucleic Acids Research*, 42(18), 11777–11791. <http://doi.org/10.1093/nar/gku805>
214. **Tong, M.-H., Mitchell, D. A., McGowan, S. D., Evanoff, R., & Griswold, M. D. (2012).** Two miRNA clusters, Mir-17-92 (Mirc1) and Mir-106b-25 (Mirc3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice. *Biology of Reproduction*, 86(3), 72. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096313>
215. **Toppiari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, a, Grandjean, P., Guillette, L. J., ... Skakkebaek, N. E. (1996).** Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*, 104 Suppl, 741–803. <http://doi.org/10.1289/ehp.96104s4741>
216. **Traore, K., Martinez-Arguelles, D. B., Papadopoulos, V., Chen, H., Zirkin, B. R. (2016).** Repeated exposures of the male Sprague Dawley rat reproductive tract to environmental toxicants: Do earlier exposures to di-(2-ethylHexyl)phthalate (DEHP) alter the effects of later exposures? *Reproductive Toxicology*, 31(61), 136–141.
217. **Tripathi, R., Mishra, D. P., & Shaha, C. (2009).** Male germ cell development: turning

on the apoptotic pathways. *Journal of Reproductive Immunology*, 83(1-2), 31-35. <http://doi.org/10.1016/j.jri.2009.05.009>

218. **Tumova, J., Andel, M., & Trnka, J. (2015).** Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 65(2), 193-207.
219. **Urriola-Muñoz, P., Lagos-Cabre, R., & Moreno, R. D. (2014).** A mechanism of male germ cell apoptosis induced by bisphenol-a and nonylphenol involving ADAM17 and p38 MAPK activation. *PLoS ONE*, 9(12), e113793. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0113793>
220. **van-Loo, G., Van-Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., ... Vandenameele, P. (2002).** The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death and Differentiation*, 9(1), 20–26. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400970>
221. **Vera, Y., Erkkila, K., Wang, C., Nunez, C., Kytanen, S., Lue, Y., ... Sinha-Hikim, A. P. (2006).** Involvement of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Apoptotic Signaling of Murine and Human Male Germ Cells after Hormone Deprivation. *Molecular Endocrinology*, 20(7), 1597–1609. <http://doi.org/10.1210/me.2005-0395>
222. **Vergara, S. P., Lizama, C., Brouwer-Visser, J., & Moreno, R. D. (2011).** Expression of BCL-2 family genes in germ cells undergoing apoptosis during the first wave of spermatogenesis in the rat. *Andrologia*, 43(4), 242–247. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01058.x>
223. **Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., ... Vaux, D. L. (2000).** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1), 43–53. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00009-X](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00009-X)
224. **Vitku, J., Heracek, J., Hampl, R., Chlupacova, T., Hill, M., Sobotka, V., ... Starka, L. (2016).** Associations of bisphenol A and polychlorinated biphenyls with

spermatogenesis and steroidogenesis in two biological fluids from men attending an infertility clinic. *Environmental International*, 89–90, 166–173.

225. **Vliegenthart, A. D., Shaffer, J. M., Clarke, J. I., Peeters, L. E., Caporali, A., Bateman, D. N., ...Dear, J. W. (2015).** Comprehensive microRNA profiling in acetaminophen toxicity identifies novel circulating biomarkers for human liver and kidney injury. *Scientific Reports*, 5, 15501. <http://doi.org/10.1038/srep15501>
226. **Volle, D. H., Mouzat, K., Duggavathi, R., Siddeek, B., Déchelotte, P., Sion, B., ... Lobaccaro, J. M. (2007).** Multiple Roles of the Nuclear Receptors for Oxysterols Liver X Receptor to Maintain Male Fertility. *Molecular Endocrinology*, 21(5), 1014–1027. <http://doi.org/10.1210/me.2006-0277>
227. **Vrijens, K., Bollati, V., & Nawrot, T. S. (2015).** MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: A systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 123(5), 399–411. <http://doi.org/10.1289/ehp.1408459>
228. **Walker, U. J., & Nogués, V. (1994).** Changes induced by treatment with aromatase inhibitors in testicular Leydig cells of rats and dogs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 46(3), 211–213. [http://doi.org/10.1016/S0940-2993\(11\)80083-7](http://doi.org/10.1016/S0940-2993(11)80083-7)
229. **Wang, G., Ying, Z., Jin, X., Tu, N., Zhang, Y., Phillips, M., ... Mivechi, N. F. (2004).** Essential Requirement for Both hsf1 and hsf2 Transcriptional Activity in Spermatogenesis and Male Fertility. *Genesis*, 38(2), 66–80. <http://doi.org/10.1002/gene.20005>
230. **Wang, Z. (2010).** MicroRNA: A matter of life or death. *World Journal of Biological Chemistry*, 1(4), 41–54. <http://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i4.41>
231. **Warf, M. B., Shepherd, B. A., Johnson, W. E., & Bass, B. L. (2012).** Effects of ADARs on small RNA processing pathways in *C. elegans*. *Genome Research*, 22(8), 1488–1498. <http://doi.org/10.1101/gr.134841.111>
232. **Wessel, D., & Flügge, U. I. (1984).** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138(1), 141–143. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](http://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6)
233. **Wu, Q., Song, R., Ortogero, N., Zheng, H., Evanoff, R., Small, C. L., ... Yan, W. (2012).** The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and

spermatogenesis. *J Biol Chem*, 287(30), 25173–25190. <http://doi.org/M112.362053>

234. **Wu, S., Hu, Y. C., Liu, H., Shi, Y. (2009).** Loss of YY1 Impacts the heterochromatic state and meiotic double-strand breaks during mouse spermatogenesis. *Molecular Cell Biology*, 29(23), 6245–6256; <http://doi:10.1128/MCB.00679-09>.
235. **Wu, Y., Fan, Y., Xue, B., Luo, L., Shen, J., Zhang, S., ... Yin, Z. (2006).** Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene*, 25(42), 5787–5800. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209576>
236. **Xie, R., Lin, X., Du, T., Xu, K., Shen, H., Wei, F., ... Sung, Y. (2016).** Targeted Disruption of miR-17-92 Impairs Mouse Spermatogenesis by Activating mTOR Signaling Pathway. *Medicine*, 95(7), e2713. <http://doi:10.1097/MD.0000000000002713>
237. **Ye, L., Zhao, B., Hu, G., Chu, Y., & Ge, R. S. (2011).** Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicology Letters*, 207(2), 137–142. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.001>
238. **Yefimova, MG., Messaddeq, N., Harnois, T., Meunier, AC., Clarhaut, J., ... Benzakour, O. (2013).** A chimerical phagocytosis model reveals the recruitment by Sertoli Cells of autophagy for the degradation of ingested illegitimate substrates. *Autophagy*, 9(5), 653–666. <http://doi:10.4161/auto.23839>.
239. **Yu B., Huang Z. (2015).** Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *Biomed Research International*, 513196. <http://doi:10.1155/2015/513196>
240. **Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003).** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, 17(24), 3011–3016. <http://doi.org/10.1101/gad.1158803>
241. **Yoshida, M., Katsuda, S. I., Takenaka, A., Watanabe, G., Taya, K., & Maekawa, A. (2001).** Effects of neonatal exposure to a high-dose p-tert-octylphenol on the male reproductive tract in rats. *Toxicology Letters*, 121(1), 21–33. [http://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00311-3](http://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00311-3)
242. **Yu, Z., Guo, R., Ge, Y., Ma, J., Guan, J., Li, S., ... Han, D. (2003).** Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis. *Biology*

of Reproduction, 69, 37–47. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012609>

243. **Zhang, S., Zhao, Y., Lei, B., Li, C., Mao, X. (2015).** PGAM1 is Involved in Spermatogenic Dysfunction and Affects Cell Proliferation, Apoptosis, and Migration. *Reproductive Sciences*, 22(10), 1236–1242. <http://doi.org/10.1177/1933719115572485>
244. **Zhao, C., Wang, G., Zhu, Y., Li, X., Yan, F., Zhang, C., ... Zhang, Y. (2016).** Aberrant regulation of miR-15b in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. *Tumor Biology*, 37(1), 177-183. <http://doi.org/10.1007/s13277-015-4269-2>
245. **Zhuang X., Li Z., Lin H., Gu L., Lin Q., ... Tzeng C-M. (2015)** Integrated miRNA and mRNA expression profiling to identify mRNA targets of dysregulated miRNAs in non-obstructive azoospermia. *Scientific Report*, 5 (7922). <http://doi.org/10.1038/srep07922>
246. **Zimmerli U. U., Hedinger, C. (1991).** Hyperplasia and hypertrophy of Leydig cells associated with testicular germ cell tumours containing syncytiotrophoblastic giant cells. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*, 419(6), 469–474.