



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EXPRESIÓN DEL GEN NANOG EN LA LÍNEA GERMINAL:
EL CONEJO COMO MODELO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
ARIANNA ELIZABETH LÓPEZ BUSTOS**

**DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

MÉXICO, D. F. Octubre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Índice de tablas y figuras.....	II
I. Introducción	
1. Desarrollo de la gónada en el ratón	1
1.1 Aspectos moleculares	4
2. Células troncales de la línea germinal	4
2.1 Origen de las células troncales espermatogoniales (SSCs)	5
2.2 Desarrollo del linaje espermatogénico	5
2.3 Nicho de las SSCs	7
2.4 Genes de pluripotencia en las células troncales espermatogoniales. Expresión de <i>Nanog</i>	9
2.5 SSCs y su relación con cáncer testicular	11
3. Bisfenol A	13
4. El conejo como modelo para el estudio de la línea germinal	17
II. Planteamiento del problema.....	20
III. Hipótesis	21
IV. Objetivo general	21
V. Estrategia experimental	22
VI. Materiales y Métodos.....	24
VII. Resultados.....	28
VIII. Discusión	39
IX. Conclusiones.....	46
X. Bibliografía	47

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen <i>Nanog</i> y del gen β - <i>actina</i> en conejo.....	26
Tabla 2. Temperaturas de alineamiento utilizadas para la estandarización de la técnica de RT-PCR del gen <i>Nanog</i>	29
Tabla 3. Condiciones de estandarización de la técnica de RT- PCR para el gen <i>Nanog</i>	30
Tabla 4. Cuantificación del cDNA purificado.....	31
Tabla 5. Concentración de RNA obtenido a partir de los testículos de conejo de diferentes edades.....	32
Tabla 6. Concentraciones promedio de RNA de los testículos de gazapos de 15 dpp tratados con BPA 50 mg/kg y sus respectivos controles.....	36
Figura 1. Genes expresados por espermatogonias troncales, progenitoras y en diferenciación.....	7
Figura 2. Nicho de las SSCs.....	8
Figura 3. Patrón de expresión del gen <i>Nanog</i> en la línea germinal durante el desarrollo embrionario.....	10
Figura 4. El cáncer testicular es iniciado en las células germinales en etapa fetal.....	12
Figura 5. Diagrama esquemático que muestra la hidrólisis del enlace éster de la cadena policarbonada liberándose moléculas de BPA.....	14
Figura 6. Principales blancos del BPA en testículos de mamíferos.....	16
Figura 7. Productos de PCR de la curva de temperatura para el gen <i>Nanog</i>	29
Figura 8. RT-PCR del gen <i>Nanog</i> de testículo de conejo recién nacido.....	30
Figura 9. cDNA purificado de la RT-PCR del gen <i>Nanog</i>	31

Figura 10. Integridad del RNA extraído de gónadas de conejo de diferentes edades postnatales.....	33
Figura 11. RT-PCR del gen <i>β-actina</i> de las diferentes muestras de testículos de edades postnatales.....	33
Figura 12. RT-PCR del gen <i>Nanog</i> en testículos de conejo en diferentes etapas postnatales.....	34
Figura 13. Perfil de expresión del gen <i>Nanog</i> en testículos de conejo en etapa neonatal.....	35
Figura 14. Animales de 2 dpp tratados con 50 mg/kg de BPA y sus respectivos controles.....	36
Figura 15. Integridad del RNA extraído de gónadas de conejo de 15 dpp del grupo control y del grupo tratado con BPA dosis 50 mg/kg.....	37
Figura 16. RT-PCR del gen <i>β-actina</i> de las muestras de testículos de 15 dpp del grupo control y el grupo tratado con BPA dosis 50 mg/kg.....	37
Figura 17. RT-PCR del gen <i>Nanog</i> en testículos de conejo de 15 dpp bajo el efecto del Bisfenol A.....	38
Figura 18. Efecto del BPA sobre la expresión del gen <i>Nanog</i> en testículos de conejo de 15 dpp.....	38

I. INTRODUCCIÓN

Las gónadas son un órgano clave en el organismo al permitir la perpetuidad de las especies. Su función más relevante es la transmisión de la información genética a la siguiente generación la cual es posible gracias a las células germinales contenidas en estos órganos. Además, desempeñan un importante papel en la producción de los factores endócrinos necesarios para el desarrollo de los genitales externos del feto con las características propias de cada sexo y el adecuado funcionamiento del sistema reproductor en el organismo adulto. Una característica particular de las gónadas que las distingue de cualquier otro órgano es la presencia de dos tipos celulares: el linaje somático y el germinal. El conocimiento actual sobre los mecanismos celulares y moleculares de la diferenciación sexual gonadal en mamíferos descansa sobre todo en el ratón como modelo. Sin embargo, dadas las diferencias espacio-temporales entre el desarrollo embrionario del ratón con respecto al del humano, surge la necesidad de explorar nuevos modelos animales, como el conejo, para la generación de conocimiento que permita correlaciones similares con los procesos que ocurren en el humano.

1. Desarrollo de la gónada en el ratón

Las Células Germinales Primordiales (CGP) son las responsables del inicio del desarrollo de la gónada. Inicialmente fueron identificadas en el ratón como un pequeño grupo de células (40 CGPs) que presentaba alta actividad de fosfatasa alcalina tejido inespecífica (TNAP, del inglés *Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase*) observadas en la base de la alantoides en la etapa embrionaria del epiblasto (7.5). Durante la formación del alantoides, las CGPs migran al intestino posterior hasta arribar a la cresta genital entre los días 9.5 y 10.5 dpc. Las CGPs se replican y alcanzan una población de alrededor de 3000 células cuando colonizan la cresta genital (Molyneaux & Wylie, 2004; Phillips *et. al.*, 2010). Estas células originarán las espermatogonias y los ovocitos en embriones XX y XY

respectivamente. Entre los 9.5-10.5 dpc se presenta proliferación celular del epitelio celómico que coincide con la llegada de las primeras células germinales primordiales a la cresta genital. Las células del epitelio celómico son las precursoras de las células de Sertoli en los machos y de las células foliculares en el caso de las hembras. Al día 11.5 de la gestación, los vasos sanguíneos provenientes del mesonefros penetran y se distribuyen alrededor de los agregados epiteliales formando así el tejido estromal que estará separado del tejido epitelial por la lámina basal (Nakatsuji & Chuma, 2001).

En el día 12.5 de la gestación, las gónadas revelan los primeros signos de dimorfismo sexual. En embriones XY se activan vías de expresión genética que conducen a una reorganización histológica para dar lugar a la formación inicial de los cordones seminíferos característicos del testículo. En el tejido estromal aparecen las células precursoras de Leydig y las células mioides que consolidarán el establecimiento de los cordones seminíferos. Los cambios durante esta etapa en los machos están coordinados por el gen *Sry* (presente en el brazo corto del cromosoma Y) que se expresa en las células precursoras de Sertoli. En el caso de los embriones XX, en esta misma etapa (12.5 dpc) no presentan cambios histológicos notables con respecto a la gónada indiferenciada pero presentan crecimiento debido a la proliferación de las células somáticas y germinales. Sin embargo la determinación a nivel molecular es paralela a la del testículo y la diferenciación del ovario a nivel histológico se alcanza poco después (Koopman, *et. al.*, 1990; Nakatsuji & Chuma, 2001).

Las CGPs presentes en la gónada continúan con el proceso de diferenciación de acuerdo al entorno somático en el que se encuentren. En el ratón, el mesonefros adyacente a la gónada de ambos sexos produce ácido retinoico (AR) el cual induce la expresión del gen *Stra8* (del inglés *Stimulated by retinoic acid*) en las células germinales de los ovarios. El producto de este gen es necesario para que las células entren en leptoteno de la meiosis I. Dejan de proliferar por mitosis e inician la meiosis (profase meiótica I) durante la vida fetal o perinatal (13.5 dpc.),

deteniéndose en la etapa de diploteno y reiniciando justo antes de la ovulación. El proceso posteriormente es detenido de nuevo en la metafase II y es completado solamente si el ovocito es fertilizado. Las células germinales del testículo en cambio, no comienzan la meiosis debido a que el AR es degradado por la enzima *Cyp26b1*. Sin embargo, entran a un arresto mitótico (G1/G0) para comenzar la meiosis durante la pubertad (Bowles *et al.*, 2007; Koubova *et al.*, 2006; McLaren & Southee, 1997).

A diferencia del ratón, en especies de mayor tiempo de gestación, las células germinales entran en meiosis después que el mesonefros adyacente ha sufrido regresión, descartando a este órgano como la fuente de ácido retinoico. La meiosis en los ovarios y la entrada en arresto mitótico en los testículos es un proceso asincrónico y asimétrico que dura varios días, semanas e incluso meses como en el humano. La duración de la primera profase meiótica (MP1) difiere ampliamente entre las especies. En el ovario fetal de ratón, la MP1 dura 6 días en una población sincronizada de ovogonias que inicia el preleptoteno a los 13.5 días post coito (dpc) y al nacimiento todos los ovocitos se encuentran en dictioteno (Bullejos & Koopman, 2004). En contraste con el ratón, el ovario fetal humano muestra una población de ovogonias que entran a MP1 de manera asincrónica. Los ovocitos inician MP1 entre las 12 y las 20 semanas de gestación. Al nacimiento, todavía se encuentra una alta población de ovocitos progresando en las diferentes fases de MP1 antes de arrestarse en el diploteno (Morelli & Cohen, 2005). Es decir, durante cinco meses, una población de ovogonias en proliferación coexiste con ovocitos en MP1 en el ovario humano en desarrollo. Este hecho, además del distinto patrón morfológico (corteza, médula, cordones ovígeros, etc.), marca una diferencia notable entre el humano y el ratón que enfatiza la necesidad de emplear un modelo animal alternativo más afín al patrón de desarrollo de la gónada humana que permita correlacionar con mayor certeza las posibles alteraciones producidas por compuestos que funcionan como disruptores endócrinos, como es el caso del Bisfenol A (BPA).

1.1 Aspectos moleculares

Las CGPs son especificadas por diversos mecanismos que incluyen la interacción de factores de transcripción, vías de transducción de señales y mecanismos de regulación epigenética. Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*) 4 y 8, son sumamente relevantes para la especificación de la línea germinal. Entre los genes implicados para la identidad de las CGPs están *Blimp1*, *Prmd14*, *Sox2*, *Stella*, *Nanos3* y *Nanog* (Calvel *et. al.*, 2010; Yabuta *et. al.*, 2006). Asimismo, miembros de la familia de genes *Hox* (*Hoxa1* y a *Hoxb1*) se encuentran reprimidos en las células germinales. Aunado a esto, se han descrito cambios epigenéticos que contribuyen a la activación de genes como *Dnmt3b*, *Ezh2*, *Glp*, *G9p* y *Pmrt5*, que conllevan a la metilación de las histonas H3K9me2, H3K27me3 y H4H2AR3me2s, lo cual sugiere que la transición entre la pluripotencia y el estado diferenciado de las CGPs masculinas implican una rápida reprogramación epigenética tanto a nivel de DNA como de histonas (Yabuta *et. al.*, 2006; Merchant-Larios & Díaz-Hernández, 2011).

Genes relacionados con pluripotencia como *Oct-4*, *Nanog* y *Sox2*, reprimidos en las células somáticas del epiblasto, mantienen su expresión en las CGPs al conservar desmetiladas ciertas secuencias reguladoras. Durante la etapa migratoria las CGPs expresan dos factores importantes para su asociación con células somáticas: un receptor tirosina cinasa y su ligando además de continuar expresando los genes de pluripotencia *Sox2*, *Oct4*, *Nanog* (Kurimoto *et. al.*, 2008).

2. Células troncales de la línea germinal

En el testículo de mamíferos, al igual que en cualquier otro órgano, residen células con características de pluripotencia que son necesarias para el crecimiento, mantenimiento y reparación de los tejidos, las cuales son capaces de mantener el balance entre la autorenovación y diferenciación. En la gónada masculina las

células con estas propiedades son llamadas células troncales espermatogoniales (SSCs, del inglés *spermatogonial stem cells*), también conocidas como células troncales de la línea germinal (GSCs, del inglés *germline stem cells*), responsables de mantener el pool de células troncales y satisfacer la demanda proliferativa de los testículos para producir millones de espermatozoides. En el ratón, la población de este tipo celular es ínfima, constituyendo únicamente alrededor del 0.03% de todas las células germinales (Tegelenbosch & de Rooij, 1993).

2.1 Origen de las células troncales espermatogoniales (SSCs)

En el ratón, las células germinales primordiales (CGPs) dan origen a los gonocitos en el día 13.5 dpc. Los gonocitos son subdivididos de acuerdo a su localización en los cordones testiculares en M-, T1- y T2-proespermatogonia. Éste último es el que finalmente coloniza la membrana basal y da lugar a la primera ronda de espermatogénesis así como al establecimiento del pool inicial de SSCs que mantienen la espermatogénesis durante toda la vida postpubertal (Kluin & de Rooij, 1981; McCarrey, 1993; Yoshida *et al.* 2006).

2.2 Desarrollo del linaje espermatogénico

Las espermatogonias están ubicadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos estando en contacto íntimo con las células de Sertoli, que son las únicas células somáticas dentro del epitelio seminífero. Son células germinales diploides que de acuerdo a sus características morfológicas nucleares se clasifican en tres tipos. El tipo A representa el estadio más primitivo debido a que la heterocromatina está ausente en el núcleo. La espermatogonia del tipo intermedio contiene una pequeña cantidad de heterocromatina mientras que el tipo B representa un estado más diferenciado al observarse en el núcleo gran cantidad de heterocromatina. Al ser este último tipo más diferenciado es el que origina los espermatoцитos que se dirigen a la capa interna del epitelio seminífero, va a meiosis y da lugar a espermátidas haploides que se diferenciarán a espermatozoides (Roosen-Runge & Giesel, 1950; Clermont & Leblond, 1953; Monesi, 1962). Dentro del tipo A existen diferentes subtipos de espermatogonias:

A_{single} (A_s), A_{paired} (A_{pr}) y A_{aligned} (A_{al}), las cuales se diferencian por el arreglo topográfico en la membrana basal de los túbulos seminíferos (Huckins, 1971; Oakberg, 1971). Las SSCs incluyen al subtipo A_{single} que es la etapa más indiferenciada. Sin embargo aún existe controversia referente a cuáles subtipos de espermatogonias poseen la característica de pluripotencia, pues algunos autores consideran que al menos algunas espermatogonias A_{pr} funcionan como células troncales e incluso este potencial se extiende hasta clonas posteriores como A_{al} (Figura 2). Dichas diferencias en la literatura son en gran parte debido a que la identificación de los diferentes subtipos no es sencilla y que no se conoce exactamente cuáles son los marcadores que permiten la identificación inequívoca de las SSCs.

Sin embargo, el modelo de las espermatogonias A_s como las SSCs sigue siendo el más aceptado. Por tal motivo las SSCs morfológicamente son descritas como células individuales indiferenciadas que no están conectadas por puentes intracelulares a diferencia de los otros subtipos de células germinales en un estado más avanzado de diferenciación (Figura 1) (Kostereva & Hofmann, 2008). Se identificaron como células troncales ya que poseen las características de autorenovación y división asimétrica importante para la homeostasis tisular (Yuan & Yamashita, 2010).

A pesar de los grandes avances en este campo, la señalización y los mecanismos moleculares que determinan la decisión de las SSCs para autorenovarse no se conocen con certeza. En gran medida esto se debe a la dificultad de su aislamiento al representar una escasa población en la gónada y que no se cuentan con los marcadores de membrana específicos para su aislamiento (Kostereva & Hofmann, 2008).

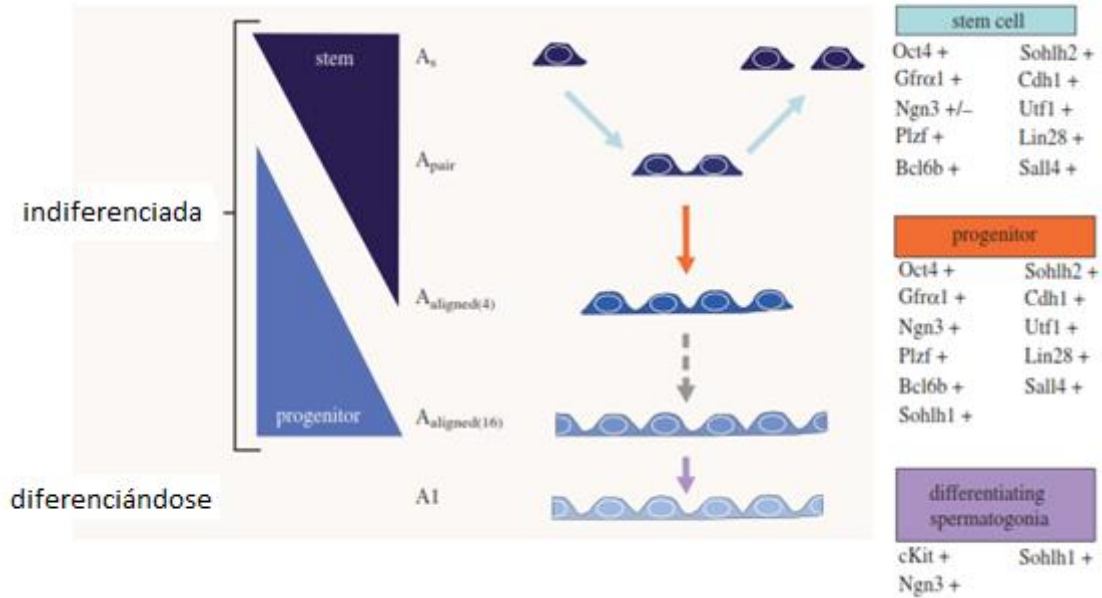


Figura 1. Genes expresados por espermatogonias troncales, progenitoras y en diferenciación. Se ha propuesto que solo la célula A_s es la responsable de la autorenovación y pluripotencia. Los genes son listados de acuerdo a su expresión en las etapas del desarrollo de las espermatogonias. Mientras la actividad de células troncales está considerada que reside en el pool de espermatogonias A_s , el triángulo a la izquierda indica que la actividad de células troncales puede extenderse de A_{pr} a algunas espermatogonias A_{al} de acuerdo a varios autores. Tomado de Phillips *et. al.*, 2010.

El estándar de oro para la identificación de las SSCs es el trasplante de éstas en los túbulos seminíferos de un ratón receptor infértil, en quienes la espermatogénesis debe de restituirse por estas células (Brinster & Avarbock 1994; Brinster & Zimmermann 1994). Mediante la combinación de diversas metodologías como el análisis por citometría de flujo, trasplante, modelos genéticos y ensayos histoquímicos, el fenotipo de las SSCs de ratón y humanos comienza a conocerse (Calvel *et. al.*, 2010; Phillips *et. al.*, 2010).

2.3 Nicho de las SSCs

Las SSCs residen en un microambiente especializado llamado "nicho", el cual controla su mantenimiento, autorenovación y diferenciación. El nicho media la señalización endócrina y parácrina que regulan características específicas como la autorenovación, pluripotencia y diferenciación (Dadoune, 2007). En los testículos

de mamíferos, las células de Sertoli, la membrana basal y los componentes del espacio intersticial entre los túbulos seminíferos son componentes del nicho. Las células de Sertoli y las células peritubulares secretan los componentes de la membrana basal a la cual las SSCs están unidas mediante moléculas de adhesión (Tung *et al.*, 1984) (Figura 2).

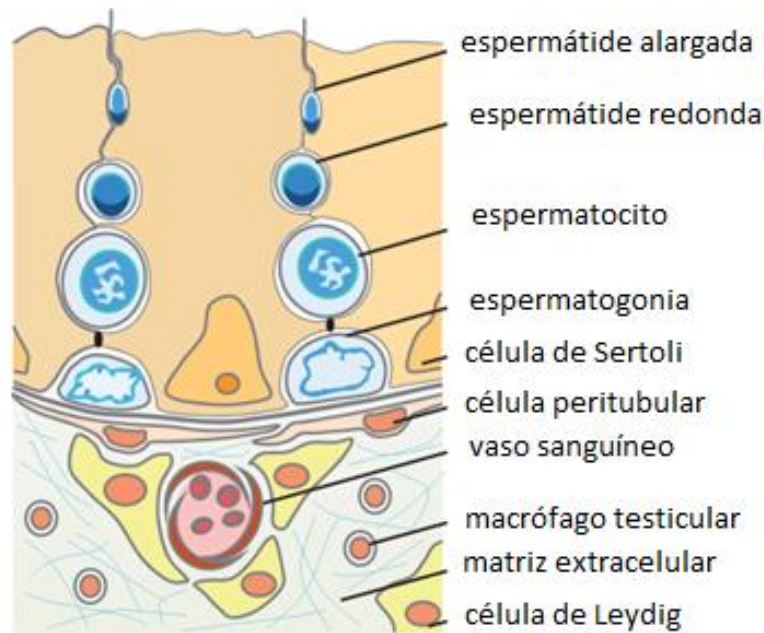


Figura 2. Nicho de las SSCs (Tomado de Calvel *et al.*, 2010)

Las células de Sertoli son células epiteliales polarizadas columnares que contribuyen en la diferenciación de las SSCs. Dichas células producen factores de crecimiento involucrados en la autorenovación, por ejemplo el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). También producen activina A, BMP4 y SCF que están implicados en la diferenciación. Aunado a las células de Sertoli, se ha sugerido que el CSF1 producido por las células de Leydig influye en el mantenimiento de las SSCs (Yuan & Yamashita, 2010).

2.4 Genes de pluripotencia en las células troncales espermatozonales. Expresión de *Nanog*

Nanog es un factor homeobox de transcripción necesario para el mantenimiento de la pluripotencia. Actúa como activador o represor transcripcional. Se une a la secuencia consenso 5'-TAAT[GT][GT]-3' o 5'-[CG][GA][CG]C[GC]ATTAN[GC]-3'. *Nanog* está involucrado en la proliferación y autorenovación de células troncales embrionarias (ES) y de la masa celular interna, por lo que su expresión es alta en estas células. Mantiene la pluripotencia en células ES y previene su diferenciación hacia los linajes del endodermo extraembrionario y trofoectodermo. Es capaz de autoreprimir su expresión en células ES en diferenciación. Es expresado en las gónadas fetales. También se expresa en carcinoma testicular, tumores derivados de células germinales y teratomas (Pan G. & Thomson A., 2007).

El gen *Nanog* ha sido ampliamente estudiado en el modelo animal de excelencia, el ratón. Se expresa en células troncales embrionarias (ES) y de la mórula, en las células de la masa celular interna (ICM) del blastocisto. En el ratón, después de la implantación, *Nanog* es detectado en el epiblasto proximal de embriones de E6.5 y E7.5 en la región del intestino primitivo. Durante la gastrulación la expresión de *Nanog* se extiende distalmente en el intestino primitivo y se confina al epiblasto. Posteriormente, en las células que comienzan a formar el mesodermo y el endodermo, los niveles de RNA de *Nanog* disminuyen (Pan G. & Thomson A., 2007)

Nanog se ha detectado en células germinales primordiales (CGP) migratorias en embriones de E7.75-8. En la línea germinal *Nanog* es relevante durante el desarrollo temprano y es considerado un marcador molecular de proliferación y migración de las CGPs en el linaje germinal del ratón (Figura 3). Asimismo, se expresa en estas células en la etapa E11.5-E12.5. En las gónadas masculinas disminuye su expresión durante el arresto mitótico (embriones en E14.5-16.5) y en las células germinales meióticas en el caso de la gónada femenina (E13.5-E14.5) (Figura 3). En la gónada adulta en ambos sexos, se ha reportado la ausencia de

expresión de *Nanog* en las células germinales (Yamaguchi *et. al.*, 2005). En estudios recientes, se ha señalado que la asociación de *Nanog* en las etapas meióticas y post-meióticas en las células de la línea germinal de la gónada masculina sugiere que *Nanog* podría estar actuando como un modificador epigenético en la reprogramación espermatogénica (Kuijk *et. al.*, 2010).

Se propone que el mantenimiento de la actividad de *Nanog* puede ser requerido para que las CGPs posean la característica de troncalidad, por lo que su expresión disminuye durante la diferenciación de estas células (Yamaguchi *et. al.*, 2009).

Su regulación es llevada a cabo principalmente por la acción sinérgica de la unión de *Oct-4* y *Sox-2* a su región promotora, los cuales actúan promoviendo la transcripción de *Nanog* en células pluripotentes. Sin embargo, éstos no son los únicos factores que regulan la expresión de este gen. Los mecanismos moleculares de regulación transcripcional de *Nanog* en las células germinales no se conocen a detalle (Yamaguchi *et.al.*, 2005; Yamaguchi *et.al.*, 2009).

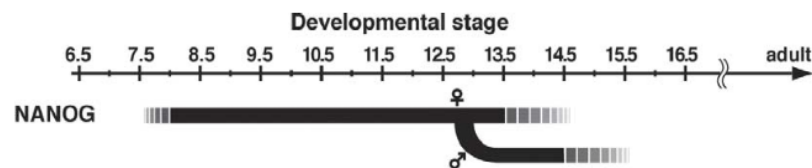


Figura 3. Patrón de expresión del gen *Nanog* en la línea germinal durante el desarrollo embrionario del ratón (Tomado de Yamaguchi *et. al.*, 2005).

2.5 SSCs y su relación con cáncer testicular

El cáncer de testículo representa el 1% de incidencia de todos los tipos de tumores, afectando a varones de edad entre los 15 y 34 años de edad. Existen dos diferentes tipos de tumores sólidos que se desarrollan en la gónada masculina. Se dividen en dos categorías principales: seminoma y no seminomas. Se ha sugerido que los tumores de la línea germinal se producen por alteraciones en los procesos moleculares y celulares durante el desarrollo fetal, que originan células de Sertoli y/o Células Germinales Primordiales (CGPs) defectuosas (Reuter, 2005; Singh *et. al.*, 2011).

De manera relevante se ha encontrado en tumores de testículo que las células troncales germinales de donde se origina el tumor tienen características diferentes y son más similares a células troncales embrionarias humanas expresando un grupo de factores de transcripción involucrados en la pluripotencia como *Oct-4*, *Nanog* y *Sox-2*. Algunos autores han sugerido que la tumorigénesis se debe a la pérdida de inhibidores específicos de la línea germinal que previenen en condiciones normales la pluripotencia y autorenovación o el aumento en las vías de señalización relacionadas, propiciando una conversión a células troncales cancerígenas de la línea germinal (Clark, 2007) (Figura 4).

De manera relevante se ha propuesto que la inhibición de la diferenciación de gonocitos a espermatogonias podría ser determinante para el desarrollo del carcinoma *in situ*. Sin embargo, actualmente no se conoce el factor que induce el arresto mitótico de los gonocitos fetales. Como consecuencia de la incapacidad de los gonocitos para entrar en el proceso de espermatogénesis, se originan poblaciones de gonocitos “descontrolados” que se han sugerido como los causantes de la formación de disgenesias, tumores y eventualmente el cáncer testicular (Rajpert De Meyts and Hoei-Hansen, 2007).

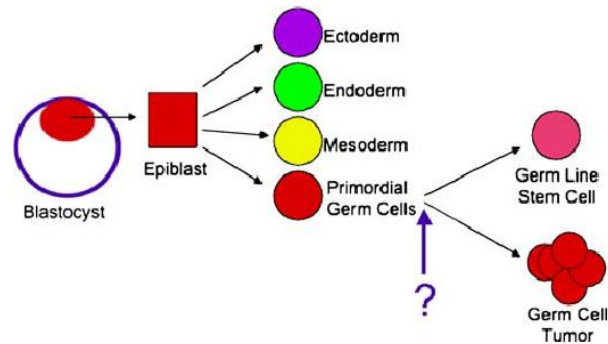


Figura 4. El cáncer testicular es iniciado en las células germinales en etapa fetal. Se ha sugerido que las células germinales tumorales resultan de un bloqueo en el desarrollo de células germinales en etapa fetal a SSCs maduras. (Tomado de Clark, 2007)

Se han detectado en las células de los carcinomas *in situ* de testículo (lesión maligna que precede al cáncer testicular, seminomas y no seminomas) altos niveles de expresión de marcadores de gonocitos fetales (no diferenciados) como lo son fosfatasa alcalina, *C-kit* y *Tra160*, pero sin detección de marcadores de células germinales en diferenciación meiótica o postmeiótica (*Boule*, *Tekt1*), por lo que se ha asociado con desdiferenciación de una célula adulta espermatogonial a una célula germinal fetal primitiva, o con anomalías en las CGPs premeióticas fetales (Clark, 2007; Singh *et. al.*, 2011).

Apoyando estas teorías se ha encontrado en células de carcinoma *in situ* en testículo, una alta expresión de varios marcadores relacionados con la pluripotencialidad de células troncales como son *Oct-3/4*, *Nanog*, *c-Kit*, *Sfrp1*. La expresión de estos factores en tejidos fetales está relacionada con el bloqueo de la diferenciación celular y asegura a un grupo de células como responsables de la autorenovación de los tejidos en la vida posnatal (Rajpert-De Meyts, 2006). Sin embargo, la expresión extemporánea de los factores de pluripotencia suele provocar el desarrollo de tumores. Asimismo se ha encontrado una sobreexpresión de *Vasa*, cambios en el estado epigenético de la línea germinal, inestabilidad genética, ganancia de material genético al cromosoma humano 12p. Junto con estas alteraciones, existe evidencia de que en tumores germinales invasivos hay una disrupción en el nicho de las células troncales

espermatozonales (SSCs), al romperse las uniones estrechas entre las células de Sertoli y las germinales, así como la presencia de células de Sertoli inmaduras o anormales (Clark, 2007).

Estas evidencias han llevado a proponer que en humanos, la transformación anormal de gonocitos fetales a células de carcinoma testicular pudiera ocurrir a partir de las 9 semanas de gestación (Rajpert-De Meyts, 2007).

La incidencia de neoplasias en los testículos se ha relacionado con la exposición a varios factores ambientales durante el desarrollo embrionario y la etapa neonatal. Dentro de los compuestos con mayor relevancia por sus posibles efectos en el sistema reproductor, se encuentran los disruptores endócrinos, como lo es el Bisfenol A.

3 Bisfenol A

El Bisfenol A (BPA) es un compuesto químico (220 Da) sintetizado en 1891. Desde su aprobación en 1963 por la FDA, el BPA ha sido empleado en la manufactura de una gran diversidad de productos de uso doméstico e industrial. Su producción se estima en más de 8 billones de libras anualmente y aproximadamente 100 toneladas son liberadas a la atmósfera cada año (Rubin, 2011).

Para su polimerización, las moléculas de BPA son unidas por enlaces éster que sufren hidrólisis al someterse a altas temperaturas y al entrar en contacto con sustancias ácidas o básicas (Figura 5). Por esta razón se presume que la población está en constante exposición a BPA en bajas dosis. Estudios del CDC de Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention*) ha estimado niveles de BPA en la orina del 92.6% de la población estudiada, siendo los niños los que presentan mayores niveles de exposición (4.5 ng/ml) en comparación con

los adultos (2.5 ng/ml), por lo que la exposición durante el desarrollo a este químico incrementa la vulnerabilidad (Welshons *et. al.*, 2006).

La principal ruta de exposición al BPA es la ingestión; sin embargo recientemente se ha planteado la posibilidad de que también podría ser por el aire y mediante la absorción por la piel, aunque aún están en debate estas últimas (Taylor *et. al.*, 2011; Rubin, 2011).

La FDA (*Food and Drug Administration*) y la EPA (*Environmental Protection Agency*) de Estados Unidos establecieron que la dosis de exposición diaria de BPA considerada como segura es de 50 mg/kg.d (U.S. EPA, 1987). Esta referencia permanece vigente a pesar del conocimiento que se ha generado en los últimos años, sobresaliendo el hecho de que los efectos a bajas dosis de BPA no son necesariamente observados a altas dosis. Las numerosas investigaciones han mostrado que niveles de exposición ambientales de BPA mucho menores que la dosis de referencia establecida como segura (50 mg/kg.d), tienen efectos importantes (Hengstler *et. al.*, 2011; Welshons *et. al.*, 2006; Rubin, 2011).

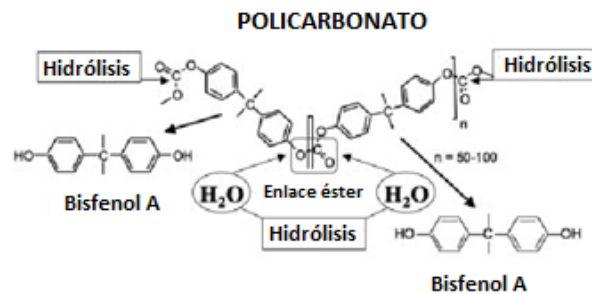


Figura 5. Diagrama esquemático que muestra la hidrólisis del enlace éster de la cadena policarbonada liberándose moléculas de BPA. (Tomado de Rubin, 2011)

Dentro de los múltiples efectos del BPA durante el desarrollo, se encontró que dosis más bajas que la considerada segura, producen perturbaciones en el sistema inmune, alteraciones en el dimorfismo sexual cerebral, cambios en los niveles de receptores esteroides del cerebro, modificación del comportamiento,

incremento de agresividad, comportamiento ansiolítico, capacidad cognitiva alterada, modificación en el peso corporal, y alteración en la homeostasis de la glucosa, entre otros (Rubin, 2011; Hengstler *et. al.*, 2011).

Debido a que el sistema reproductivo regula en gran parte la producción y acción hormonal, los disruptores endócrinos como el BPA son susceptibles de inducir alteraciones durante el desarrollo y la vida adulta. En el aparato reproductor femenino se han reportado efectos como la modificación del ciclo estrogénico, alteraciones en el desarrollo de la glándula mamaria incluyendo hiperplasias y lesiones preneoplásicas, así como cambios en el útero y ovarios (Taylor *et. al.*, 2011; Schugg *et. al.*, 2011).

En el hombre, el BPA se ha ligado a cambios en la próstata incluyendo el desarrollo de neoplasias; función reproductiva disminuida o infertilidad. El desarrollo fetal puede ser alterado ocasionando anormalidades en el tracto urogenital, testículos hipoplásicos, criptorquidia e hipospadias así como cáncer testicular de la línea germinal (Taylor *et. al.*, 2011; Schugg *et. al.*, 2011). Los efectos del BPA se deben principalmente a la alteración directa y/o indirecta del nicho de las células germinales por interacciones autócrinas, parácrinas y endócrinas. Se ha sugerido que es por la afectación a las Células de Sertoli en diferentes niveles, induciendo apoptosis de las células germinales que podría explicar una disminución en la producción de espermatozoides (Figura 6) (Tainaka *et. al.*, 2012; Lagos-Cabré & Moreno, 2012)

Los efectos del BPA no dependen exclusivamente de la dosis sino también de la ventana de tiempo en que ocurre la exposición. La etapa fetal y neonatal representan los periodos de mayor vulnerabilidad al BPA. La hipótesis de DOHaD (orígenes en el desarrollo de la salud y en la enfermedad) propuesta por Barker D.J. en 1997, la cual describe que las interacciones entre el organismo en desarrollo y el ambiente incrementan la susceptibilidad de que el individuo desarrolle ciertas enfermedades en la etapa adulta, se ha extrapolado al área de

la endocrinología estableciéndose que la exposición a disruptores endócrinos en las etapas tempranas del desarrollo puede tener efectos negativos en la salud a largo plazo en la etapa adulta (Schugg *et. al.*, 2011)

Entre los mecanismo de acción del BPA se encuentra su habilidad de unirse a receptores estrogénicos de membrana clásicos y no clásicos, así como al receptor 30 de la proteína G acoplada (GPR30) y por vías no genómicas (Taylor *et. al.*, 2011) que resultan en cambios de la expresión genética, la actividad de las proteínas y la comunicación celular. De manera relevante, la investigación referente al BPA ha arrojado evidencia acerca de las alteraciones que produce a nivel epigenético en la línea germinal (Rubin, 2011; Schugg *et. al.*, 2011).

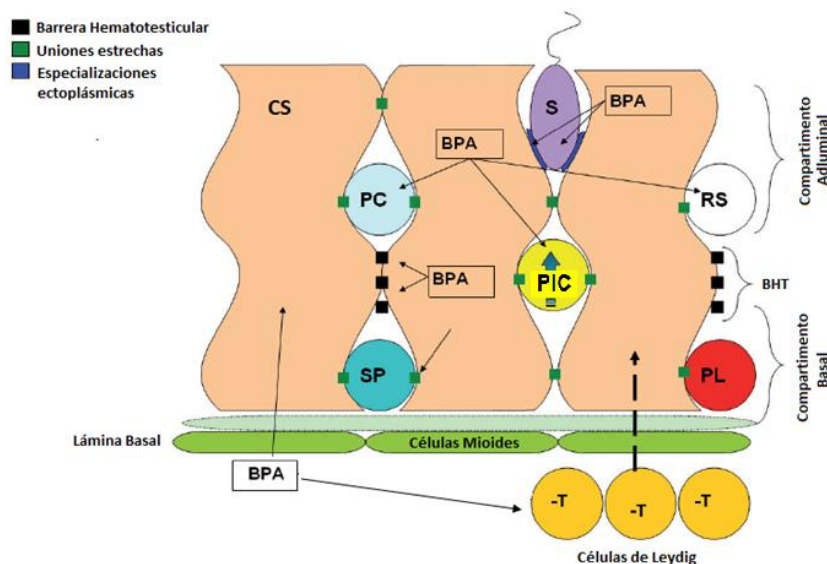


Figura 6. Principales blancos del BPA en testículos de mamíferos. El bisfenol A (BPA) altera la espermatogénesis a diferentes niveles. Reduce los niveles de testosterona plasmática e intratesticular (T) por afectación a las células de Leydig, resultando en un decremento de la espermatogénesis. Asimismo, estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que las células de Sertoli (CS) son blancos primarios de este compuesto químico, afectando su metabolismo, expresión de proteínas y morfología. El BPA induce la apoptosis de espermatogonía (SP), espermatocito en paquiteno (PC) y espermatocito en preleptoteno (PIC) por afectación de CS. La barrera hematotesticular (BHT), la cual separa el compartimento adluminal del basal dentro de los túbulos seminíferos, especializaciones ectoplásmicas, las cuales mantienen unidas a las espermátides alargadas (S) a CS, y uniones estrechas son perturbadas por el BPA y otros disruptores endócrinos, produciendo desprendimiento y apoptosis de las células germinales (Modificado de Lagos-Cabré & Moreno, 2012)

4 El conejo como modelo para el estudio de la línea germinal

El estudio y caracterización de las espermatogonias troncales (SSCs, *spermatogonial stem cells*) se ha realizado principalmente en el ratón como modelo experimental. Aunque la información obtenida se ha extrapolado al humano, existen diferencias significativas entre ambas especies. El patrón de desarrollo de la gónada del ratón comparado con mamíferos de mayor talla y tiempo de gestación, muestra variaciones sustanciales en las redes moleculares que subyacen al establecimiento, mantenimiento, proliferación y autorenovación de las SSCs. Por lo tanto, las diferencias espacio-temporales interespecíficas involucradas en el establecimiento y maduración de la línea germinal, es pertinente explorarlas en modelos animales alternativos.

El conejo resulta ser un modelo más adecuado al poseer ciertas ventajas sobre el ratón, ya que el patrón de desarrollo gonadal es similar al humano en términos estructurales. El establecimiento de dos regiones gonadales (la médula y la corteza) así como la asincronía en que los gonocitos entran en arresto mitótico, hacen del conejo un mejor modelo experimental para el estudio y caracterización de las SSCs. Así mismo, las alteraciones de la línea germinal provocadas por disruptores endócrinos como el BPA en etapas tempranas del desarrollo, potencialmente brindan una mejor correlación con los efectos en humanos (Fischer *et. al.*, 2012).

Las interacciones entre células somáticas y germinales juegan un papel determinante en la diferenciación normal de la gónada fetal. A diferencia de los roedores, en humanos el arresto mitótico de los gonocitos, es un proceso asincrónico concomitante a la morfogénesis de los cordones seminíferos y la diferenciación del tejido estromático que incluye a las células de Leydig. Durante este periodo se establece el destino de los gonocitos en cuanto a su capacidad como células troncales pluripotentes y/o espermatogonias progenitoras que seguirán la vía de espermatogénesis (Merchant-Larios & Díaz-Hernández, 2011). La asincronía con la que se determina el destino de los gonocitos puede

modificarse por la acumulación de agentes químicos contaminantes en el contexto de la gónada fetal (Rubin, 2011). Perturbaciones en la interacción parácrina entre células de Sertoli y Leydig, pueden desestabilizar redes de expresión génica en gonocitos adyacentes, haciéndolos susceptibles de provocar disgenesias y cánceres testiculares (Rajpert De Meyts & Høeij-Hansen, 2007).

Entre las características del desarrollo gonadal del conejo está el hecho de que la gónada bipotencial, al igual que en humanos, posee dos territorios bien definidos: la corteza y la médula. Las células germinales primordiales (CGP) se establecen en ambos territorios y su determinación depende de su ubicación. En los machos, las CGP proliferan en la médula y forman gonocitos y espermatogonias que entran en un periodo de reposo mitótico hasta la pubertad en que inician el proceso de espermatogénesis. En las hembras, las CGP inician la meiosis y forman ovocitos en la médula y en la corteza. Según el modelo del ratón, el ácido retinóico (AR) producido en el mesonefros adyacente, es responsable del inicio de la meiosis en ambos sexos. La diferencia radica en que en los machos, las células de Sertoli degradan al AR, impidiendo la entrada en meiosis de los gonocitos. Sin embargo, es posible que en testículos fetales de especies de mayor talla donde coexisten gonocitos proliferando, y en arresto mitótico como el conejo y el humano, algunos gonocitos expuestos a niveles variables de AR inicien una meiosis ectópica y mantengan una inestabilidad genética al entrar en arresto mitótico (Fischer *et. al.*, 2012; Merchant-Larios & Díaz-Hernández, 2011).

La transición gonocito-espermatogonia en arresto mitótico ocurre en íntima asociación con las células de Sertoli en los cordones seminíferos. La diferenciación fisiológica de Sertoli a su vez, está asociada a la diferenciación esteroidogénica de las células de Leydig. En el conejo, como en el humano, la entrada en reposo mitótico de los gonocitos es gradual y ocurre en un largo periodo en un contexto somático cambiante (Merchant-Larios & Díaz-Hernández, 2011). Es decir, coexisten grupos de gonocitos proliferando con grupos de gonocitos entrando en G1/G0 del ciclo celular en un contexto de células somáticas

en diferentes estados de diferenciación. Es posible que tal periodo haga vulnerables a ciertas poblaciones de gonocitos al efecto disruptor de agentes contaminantes como el Bisfenol A

II. Planteamiento del problema

En la gónada masculina, los gonocitos pasan por varias etapas de expresión génica antes de estabilizarse en la de reposo mitótico. Los genes que caracterizan el estado pluripotencial de los gonocitos, abaten su expresión conforme avanza su proceso de diferenciación. Cabe la posibilidad que grupos de gonocitos expuestos a niveles variables de ácido retinóico (por efecto del BPA) en el testículo temprano, sufran alteraciones en la estabilidad génica, que podrían mantener al entrar en reposo mitótico. Después, al reiniciar la actividad proliferativa y la espermatogénesis en la pubertad, las espermatogonias descendientes de gonocitos alterados, pueden formar tumores testiculares al quedar fuera del control fisiológico del testículo adulto.

En el presente trabajo se pretende establecer el patrón de expresión de uno de los marcadores de pluripotencia de las células germinales, *Nanog*, durante el desarrollo normal y bajo el efecto de un disruptor endócrino, el Bisfenol A, en el modelo de conejo.

III. Hipótesis

1. El perfil de expresión del gen *Nanog* es alterado por efecto del Bisfenol-A en el testículo perinatal del conejo.

IV. Objetivo general

Caracterizar el efecto del Bisfenol-A sobre el perfil de expresión del gen de pluripotencia *Nanog* en testículos de conejo antes, durante y después del arresto mitótico de los gonocitos.

- *Objetivos particulares:*
- Comparar la expresión normal del gen *Nanog* en testículos de conejos de 15 dpp con aquellos animales tratados con BPA durante la etapa neonatal.

V. Estrategia experimental

▪ *Caracterización del perfil de expresión de Nanog en testículos de conejo*

Se emplearon conejos de la raza Nueva Zelanda, la cual se eligió en base al trabajo de Díaz-Hernández en el 2008, quien describió a detalle la diferenciación sexual de esta especie.

Se sacrificaron conejos de diferentes edades para establecer el perfil de expresión del gen *Nanog*, mediante una sobredosis de pentobarbital sódico. Se disecaron las gónadas de conejos macho y se congelaron a -70° C. Las edades de los animales sacrificados fueron recién nacido, 7 días postparto, 16 días postparto y 3 meses postparto. Debido a que a los 15-16 dpp los gonocitos en el conejo entran en arresto mitótico, se eligieron las edades antes mencionadas para caracterizar la expresión de *Nanog* antes, durante y después de este proceso debido a que no existen reportes en la literatura.

▪ *Efecto del BPA sobre la expresión de Nanog en testículos de conejo*

Los conejos ingresados al bioterio fueron cruzados para el establecimiento de las camadas que serían empleadas para el trabajo experimental. De esta manera, después de 31 días post-coito (dpc) se obtuvieron las crías. Al momento del nacimiento se registró el número de gazapos muertos y vivos.

Para el protocolo de experimentación con el Bisfenol A, se utilizaron conejos en la etapa neonatal. Una camada fue considerada como grupo problema, por lo que los gazapos fueron tratados con 100 μ L de una dosis de BPA de 50 mg/kg/día (disuelto en etanol 5% y aceite de maíz empleados como vehículo) desde el primer día postparto hasta los 10 dpp mediante la administración subcutánea (Rodríguez *et al.*, 2010). Esta dosis de BPA es el llamado nivel de afectación observable más bajo (LOAEL, *Lowest Observed Affect Level*) que fue establecido en un estudio de carcinogénesis por 2 años en roedores adultos

expuestos a altas dosis de BPA (50 mg/kg/día) (Rubin, 2011). Al grupo control se le administraron 100 µL vía subcutánea de la mezcla vehículo (etanol 5%-aceite de maíz) por el mismo periodo que el grupo problema.

A los 15 dpp se sacrificaron los gazapos machos de ambos grupos con una sobredosis de pentobarbital sódico, de acuerdo a los lineamientos de bioética establecidos en la NOM-062-ZOO-1999. Se disecaron los testículos y se almacenaron a -70° C. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de RNA y se realizó la RT-PCR para el gen *Nanog*.

VI. Materiales y Métodos

Animales

Se emplearon conejos de la raza Nueva Zelanda proporcionados por la granja de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Itzcalli. Los gazapos se sacrificaron en base a los lineamientos establecidos por el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM para animales de experimentación, empleando una sobredosis de pentobarbital sódico, de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

Extracción de DNA

Los testículos de los conejos de diferentes edades se congelaron y almacenaron a -70° C. La extracción del DNA genómico se realizó con el reactivo DNAzol (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA). La concentración fue determinada por la absorbancia a 260 nm y su pureza mediante la relación 260/280, considerando adecuado el valor de 1.8 ± 0.5 .

Extracción de RNA

Se realizó la disección de las gónadas, se congelaron en hielo seco y almacenaron a -70° C. El RNA total fue aislado usando las columnas de intercambio iónico RNeasy (Quiagen). Para evitar la contaminación con DNA genómico se trató con 1 μ l de DNAsa RQ1 por microgramo de RNA y 1 μ l del buffer de reacción de DNAsa 10x (RQ1 RNase-Free DNase, de Promega; Cat.# M6101) a 37° C por 30 minutos. Posteriormente se inactivó la DNAsa con 2 μ l del reactivo de inactivación de DNAsa (RQ1 DNase Stop Solution, de Promega), incubando la mezcla de reacción a 65° C por 10 minutos. La calidad y pureza del RNA fue verificada por análisis espectrofotométrico de la relación 260/280,

considerando adecuado el valor de 2 ± 0.5 . La concentración del RNA fue determinada por la absorbancia a 260 nm.

Diseño de oligonucleótidos

Se realizó la búsqueda de la secuencia nucleotídica del gen *Nanog* del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en la base de datos de NCBI. Su secuencia ha sido predicha mediante análisis computacional automatizado. Por esta razón, se tomó la secuencia del mRNA y se realizó un alineamiento múltiple considerando las secuencias reportadas para otras especies: rata (*Rattus norvegicus*), cerdo (*Sus scrofa*), buey (*Bos taurus*), macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) y humano (*Homo sapiens*). Las regiones más conservadas entre especies fueron las elegidas para el diseño de los oligonucleótidos. En la plataforma de internet OligoAnalyzer del sitio web de *Integrated DNA Technologies* (IDT) (Disponible en <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) se diseñaron los pares de oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 1, indicando el tamaño del transcrito. Asimismo, se indica la secuencia de los oligonucleótidos para el gen β -actina .

Las bandas de agarosa con los amplicones obtenidos se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction (Quiagen). Los fragmentos obtenidos se secuenciaron en ambos sentidos. Dichas secuencias se analizaron con el programa BLAST de NCBI con el fin de corroborar la identidad de los genes mediante la homología con otras especies de mamífero.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *Nanog* y del gen β -actina en conejo.

Gen	Nombre de oligonucleótidos	Oligonucleótidos 5'--->3'	Longitud (pb)	Tamaño del transcrito (pb)
<i>Nanog</i>	Nanog/1-F	cag aaa tac ctc agc ctt cag	21	363
	Nanog/1-R	ctg gaa caa tca ggc ctg g	19	
	Nanog/2-F	cct ggt tcc aga acc aaa g	19	400
	Nanog/2-R	ctt gga aac tgt tgg gga aag	21	
β-actina	Actina-S	atg tgc aag gcc ggc ttc gc	20	300
	Actina-AS	ggt ctc aaa cat gat ctg gg	20	

RT-PCR

Para la transcripción reversa (RT) se utilizó 1 μ g del RNA total tratado con DNasa a 42° C por 60 min en un volumen total de 20 μ l del reactivo de transcriptasa reversa RNasa H II Superscript de 100 U (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5 mM de cada dNTP, 0.025 μ g de oligo(dT) y buffer First-Strand 1x (250 mM Tris-HCl, pH 8.3 a temperatura ambiente, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ y 10 mM de ditioneitol).

Para la reacción de PCR se utilizó 1 μ l del cDNA sintetizado en un volumen de reacción de 30 μ l (buffer de reacción 1x, 1.5 mM de MgCl₂, 0.3 μ M de cada oligonucleótido, 0.3 mM de cada dNTP y 2.5 IU de Taq Polimerasa Platinum, Invitrogen No. de Cat. 10966030). La calidad del cDNA obtenido se verificó mediante la amplificación del gen endógeno β -actina. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1% y visualizados con bromuro de etidio.

Análisis densitométrico

Se capturaron las imágenes de los geles obtenidos mediante la utilización del equipo *Molecular Imager Fx* (BioRad). Finalmente se realizó un análisis densitométrico para determinar la expresión relativa del gen *Nanog*, para lo cual se correlacionó con la amplificación del gen β -actina.

Análisis estadístico

Mediante el empleo del programa Origin 8.6, se obtuvieron los parámetros estadísticos referentes a la media y error estándar de los datos obtenidos en el análisis densitométrico, los cuales se representaron gráficamente. Posteriormente se analizaron los datos para evaluar la significancia estadística entre la expresión de *Nanog* en las diferentes edades y bajo la influencia del BPA a los 15 dpp, empleando la prueba estadística de Anova, en la cual, un valor de $p < 0.05$ indica significancia estadística. Cabe destacar que para el perfil de expresión de *Nanog* se evaluaron tres muestras de animales distintos de la misma edad, mientras que para la determinación del efecto del BPA se emplearon tres muestras control y tres problema. Dichas determinaciones de cada muestra fueron realizadas por triplicado.

VII. RESULTADOS

Estandarización de RT-PCR

- *Extracción de DNA y RNA*

Para verificar los iniciadores diseñados y estandarizar la RT-PCR, se utilizó primeramente el DNA extraído de riñón, y posteriormente el RNA proveniente de las gónadas con la finalidad de optimizar las muestras.

De la extracción de DNA de riñón de conejo recién nacido, se obtuvo una concentración de 320 ng/μL y se verificó la pureza mediante la relación A_{260}/A_{280} la cual fue de 1.9.

Después de la extracción del RNA de testículos de conejos recién nacidos se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó obteniéndose una concentración de 458.24 ng/μL con un valor de 1.98 de la relación A_{260}/A_{280} . Posteriormente se sintetizó el cDNA que se utilizó para la amplificación del transcrito de interés bajo las condiciones estandarizadas.

- *Curvas de temperatura con los oligonucleótidos diseñados*

Se realizó la estandarización de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos diseñados para el gen *Nanog*, utilizando el DNA extraído de riñón de conejo recién nacido. Los amplicones obtenidos después de 30 ciclos de reacción, fueron visualizados en geles de agarosa al 1%. Los rangos de temperatura probados se muestran en la tabla 2. La figura 7 muestra las bandas obtenidas a las diferentes temperaturas probadas con los oligonucleótidos diseñados. Para el caso de los oligonucleótidos *Nanog/1-Forward* y *Nanog/1-Reverse* (Figura 7a) la banda esperada era de 363 pb, mientras que con el par *Nanog/2-Forward* y *Nanog/2-Reverse* (Figura 7b) la banda obtenida al emplear

DNA sería de 921 pb, mientras que con RNA, el transcrito esperado sería de 400 pb.

Tabla 2. Temperaturas de alineamiento utilizadas para la estandarización de la técnica de RT-PCR del gen *Nanog*.

Gen	Gradiente de temperatura probado
<i>Nanog</i>	54°, 56°, 58°, 60°, 62° C

* 30 ciclos de reacción

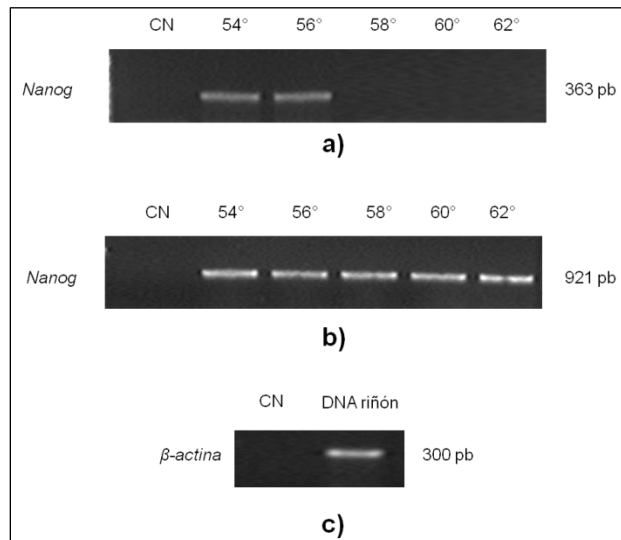


Figura 7. Productos de PCR de la curva de temperatura para el gen *Nanog*. Para establecer la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos diseñados, se realizó la PCR a diferentes temperaturas (54°, 56°, 58° y 60° C) durante 30 ciclos de reacción, empleando DNA extraído de riñón de conejo. a) Amplicones de 363 pb obtenidos con los oligonucleótidos *Nanog*/1-Forward y *Nanog*/1-Reverse. Se visualizaron únicamente a las temperaturas de 54° C y 56° C. b) Amplicones de 921 pb obtenidos con los oligonucleótidos *Nanog*/2-Forward y *Nanog*/2-Reverse. Se visualizaron en todas las temperaturas analizadas. c) Amplicón obtenido de la PCR del gen β -actina empleando el DNA de riñón de conejo. La reacción se llevó a cabo a 56° C durante 28 ciclos (CN: Control negativo de reacción).

- *Reacción de PCR*

Después de elegir la posible temperatura óptima de alineamiento (58°C), se realizó la reacción de PCR con el cDNA sintetizado a partir del RNA extraído de las gónadas masculinas. La tabla 3 señala los oligonucleótidos empleados, el tamaño del amplicón y las condiciones de reacción establecidas.

Tabla 3. Condiciones de estandarización de la técnica de RT- PCR para el gen *Nanog*

Gen	Oligonucleótidos empleados	T° óptima de alineamiento	No. de ciclos	Tamaño del amplicón
<i>Nanog</i>	<i>Nanog/2-F</i> <i>Nanog/2-R</i>	58° C	30 ciclos	400 pb

Los amplicones obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1% como lo muestra la figura 8. Se incluyó una reacción utilizando DNA extraído de riñón en lugar de cDNA proveniente del RNA de gónada, para verificar el tamaño de las bandas, ya que la presencia de intrones en dicho gen origina un amplicón de tamaño diferente. Al emplear DNA genómico se obtiene una banda de 921 pb, mientras que el transcrito es de 400 pb.

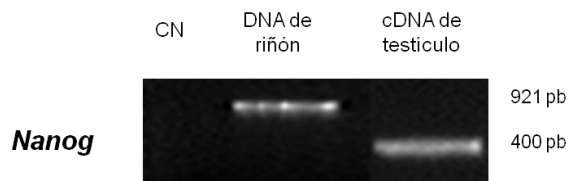


Figura 8. RT-PCR del gen *Nanog* de testículo de conejo recién nacido. El tamaño del amplicón obtenido en la reacción de RT-PCR a partir del cDNA de testículo fue de 400 pb. Asimismo, se incluyó una reacción de PCR con el DNA extraído de riñón para mostrar la diferencia en el tamaño de los amplicones (921 pb) (CN: Control negativo de reacción).

Habiendo establecido las condiciones para la reacción de PCR, las bandas de agarosa de los amplicones obtenidos se purificaron. La concentración del cDNA purificado se cuantificó (tabla 4) y se visualizó en un gel de agarosa al 1% (Figura 9).

Tabla 4. Cuantificación del cDNA purificado

Gen	Concentración DNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
<i>Nanog</i>	134	1.95

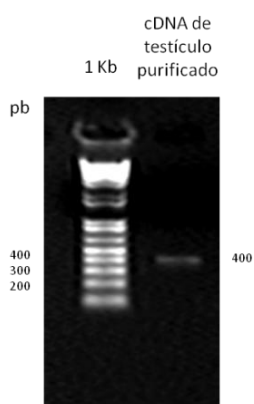


Figura 9. cDNA purificado de la RT-PCR del gen *Nanog*. En el gel de agarosa al 1% se observa el amplicón del tamaño esperado (400 pb) correspondiente al gen *Nanog* (Marcador de peso molecular: 1 Kb. CN: Control negativo de reacción).

El cDNA purificado se mandó a secuenciar para verificar la identidad del amplicón obtenida. Con la secuencia nucleotídica arrojada por la secuenciación, se realizó un alineamiento en BLAST corroborando que los oligonucleótidos diseñados amplifican el gen de interés (Gen ID: 100345758; disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100345758>)

Caracterización del perfil de expresión de Nanog en testículos de conejo

Para conocer el posible efecto del BPA sobre la expresión del gen de pluripotencia *Nanog* en la línea germinal del conejo, es necesario primeramente conocer el perfil de expresión normal en este animal ya que no existen reportes en la literatura. Para lo anterior, se sacrificaron tres gazapos macho de cada una de las siguientes edades: recién nacido, 7 dpp, 16 dpp y 3 mpp. Se congelaron las gónadas y se extrajo el RNA.

En la figura 10 se muestra la integridad del RNA extraído de las muestras, el cual fue tratado con la enzima DNasa para eliminar el posible DNA genómico presente. En la tabla 5 se muestran las concentraciones promedio obtenidas del RNA de las diferentes muestras así como la relación de absorbancia 260/280.

Tabla 5. Concentraciones de RNA obtenido a partir de los testículos de conejo de diferentes edades

Muestra de RNA	Concentración de RNA (ng/μl)	Absorbancia 260/280
Testículo de conejo recién nacido (1)	216	2.01
Testículo de conejo recién nacido (2)	367.2	2.01
Testículo de conejo recién nacido (3)	217.5	2.0
Testículo de conejo de 7 dpp (1)	226.6	2.02
Testículo de conejo de 7 dpp (2)	224.1	2.01
Testículo de conejo de 7 dpp (3)	182.6	2.02
Testículo de conejo de 16 dpp (1)	260.4	2.03
Testículo de conejo de 16 dpp (2)	272.1	2.01
Testículo de conejo de 16 dpp (3)	181.5	2.0
Testículo de conejo de 3 meses postparto (1)	205.6	2.03
Testículo de conejo de 3 meses postparto (2)	272.7	2.02
Testículo de conejo de 3 meses postparto (3)	261.8	2.03

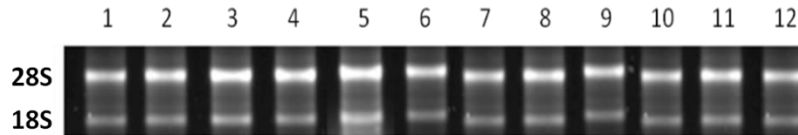


Figura 10. Integridad del RNA extraído de gónadas de conejo de diferentes edades postnatales. 1- 3: Testículos de recién nacido; 4-6: Testículos de 7 dpp; 7-9: Testículos de 16 dpp; 10-12: Testículos de 3 meses. En el gel de agarosa al 1% se observa la calidad e integridad del RNA, distinguiéndose las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S.

Habiendo comprobado la calidad e integridad del RNA, se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de 1000 ng de RNA. Se verificó la síntesis exitosa del cDNA mediante la PCR del gen β -actina (Figura 11).

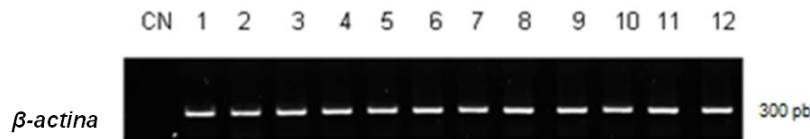


Figura 11. RT-PCR del gen β -actina de las diferentes muestras de testículos de edades postnatales. 1-3. Testículos de recién nacido; 4-6. Testículos de 7 dpp; 7-9. Testículos de 16 dpp; 10-12. Testículos de 3 meses. El gel de agarosa al 1% muestra los amplicones obtenidos de la RT-PCR del gen β -actina (300 pb), el cual se utilizó como control interno de la muestra para verificar su calidad (CN: Control negativo de reacción).

Posteriormente se realizó la RT-PCR para el gen Nanog de las gónadas de conejo en las diferentes etapas analizadas (Figura 12). Cabe destacar que la reacción de PCR de cada una de las muestras se realizó por triplicado.

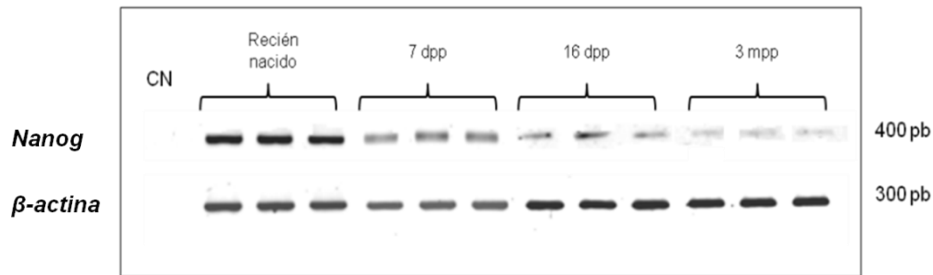


Figura 12. RT-PCR del gen *Nanog* en testículos de conejo en diferentes etapas postnatales. Se muestran los amplicones obtenidos para el gen *Nanog* y el gen β -actina en las diferentes edades. Para cada grupo se analizaron 3 animales diferentes y cada determinación se realizó por triplicado. La intensidad de las bandas correlaciona con la expresión del gen *Nanog*. En las gónadas de los conejos recién nacidos se observa la mayor expresión de este gen, la cual va disminuyendo gradualmente, siendo mínima a la edad de 3 meses postparto. Asimismo se muestra la expresión del gen β -actina como control interno de la reacción (CN: Control negativo de reacción).

Con las imágenes capturadas en el equipo *Molecular Imager Fx* (BioRad), se llevó a cabo el análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Después, se determinó el valor de la media y el error estándar. El análisis estadístico por la prueba de Anova, arrojó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de recién nacido con todas las edades analizadas, puesto que en la etapa neonatal es donde la expresión es más alta. Asimismo, hay diferencia en la expresión de este gen a los 7 dpp con respecto a la que se presenta a los 16 dpp y 3 mpp. Sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico y con la técnica empleada, entre la edad de 16 dpp y 3 mpp no hay cambios significativos en los niveles de expresión de *Nanog* ($p > 0.05$) (Figura 13).

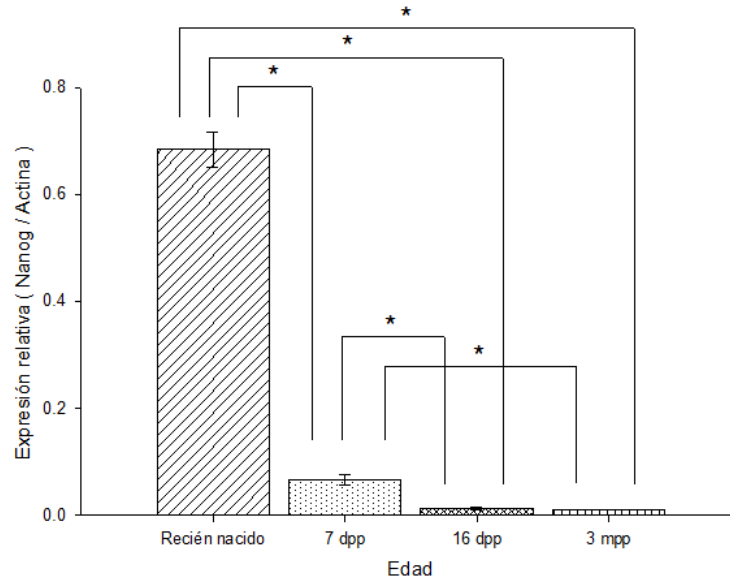


Figura 13. Perfil de expresión del gen *Nanog* en testículos de conejo en etapa neonatal. Se sacrificaron gazapos recién nacidos, de 7 dpp, 16 dpp y 3 mpp (tres animales por edad) y se obtuvieron las gónadas. La expresión del gen *Nanog* se evaluó mediante RT-PCR, realizándose la determinación por triplicado. La expresión relativa fue normalizada con la expresión de β -actina. Al nacimiento se presenta la mayor expresión de *Nanog*, la cual disminuye gradualmente a los 7 dpp, 16 dpp y 3 mpp. * Indica significancia estadística ($p < 0.05$) al comparar entre edades. Prueba estadística: Anova.

Efecto del BPA sobre la expresión de Nanog en testículos de conejo

Se administró al grupo problema (3 gazapos) 100 μ L de BPA en una dosis de 50 mg/kg vía subcutánea y al grupo control (3 gazapos) 100 μ L de la mezcla etanol 5%-aceite de maíz, desde el nacimiento hasta los 10 dpp. Desde el segundo día de tratamiento se observó en los animales tratados con BPA una lesión tisular en la zona de la inyección como se muestra en la figura 14.

A los 15 dpp se sacrificaron los gazapos de ambos grupos y se disecaron las gónadas. Posteriormente se extrajo el RNA, se trató con DNAsa para eliminar el posible DNA genómico presente en las muestras y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1% (Tabla 6 y figura 15).

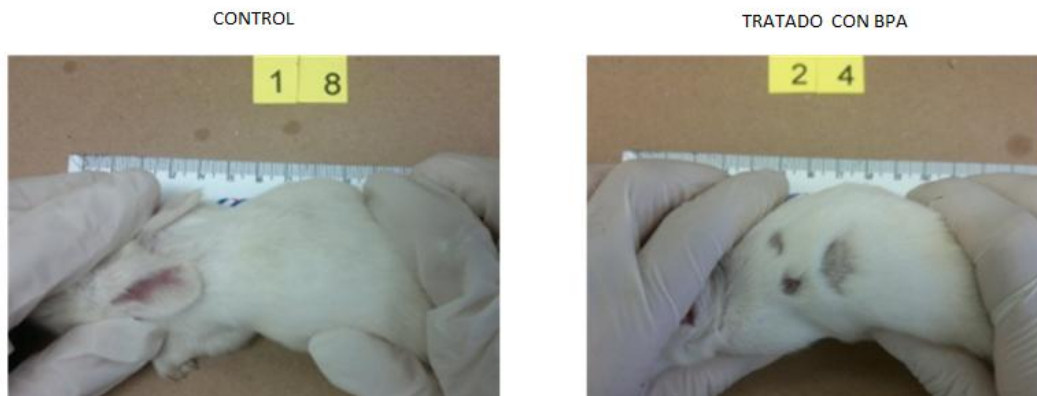


Figura 14. Animales de 2 dpp tratados con 50 mg/kg de BPA y sus respectivos controles. Se observan lesiones tisulares en los gazapos que fueron tratados con el disruptor endócrino.

Tabla 6. Concentraciones promedio de RNA de los testículos de gazapos de 15 dpp tratados con BPA dosis 50 mg/kg y sus respectivos controles

Muestra de RNA	Concentración de RNA (ng/μl)	A 260/280
Testículo de conejo de 15 dpp (Control 1)	443.7	2.01
Testículo de conejo de 15 dpp (Control 2)	344.9	2.0
Testículo de conejo de 15 dpp (Control 3)	381.4	2.1
Testículo de conejo de 15 dpp (BPA 1)	283.5	2.02
Testículo de conejo de 15 dpp (BPA 2)	373.8	2.0
Testículo de conejo de 15 dpp (BPA 3)	398.1	2.01

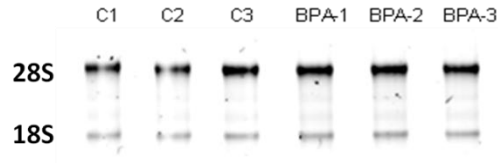


Figura 15. Integridad del RNA extraído de gónadas de conejo de 15 dpp del grupo control y del grupo tratado con BPA dosis 50 mg/kg. Controles: C1, C2, C3. Tratados con BPA: BPA-1, BPA-2, BPA-3. En el gel de agarosa al 1% se observa la calidad e integridad del RNA extraído, distinguiéndose las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S.

Con el RNA extraído se sintetizó el cDNA de las muestras a partir de 1000 ng. Posteriormente se verificó la reacción mediante la amplificación del gen *Actina* (Figura 16).

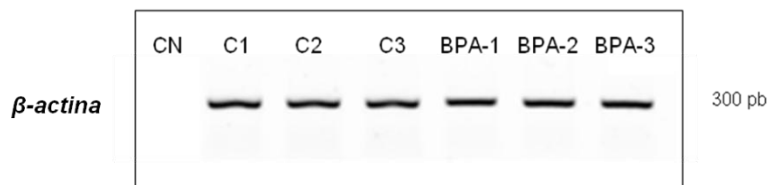


Figura 16. RT-PCR del gen β -actina de las muestras de testículos de 15 dpp del grupo control y el grupo tratado con BPA dosis 50 mg/kg. 1, 2, 3. Controles: C1, C2, C3. Tratados con BPA: BPA-1, BPA-2, BPA-3. El gel de agarosa al 1% muestra el amplicón obtenido del gen β -actina, comprobando la síntesis exitosa del cDNA.

Se realizó la RT-PCR para el gen *Nanog* a partir del RNA extraído de las gónadas de los gazapos tratados con BPA y sus respectivos controles. Cabe destacar que la reacción de PCR de cada una de las muestras se realizó por triplicado (Figura 17).

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos determinando que no hay diferencia significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$), lo cual sugiere que la expresión del gen *Nanog* en el conejo no se ve modificada por el efecto del disruptor endócrino BPA en la etapa de 15 dpp (Figura 18).

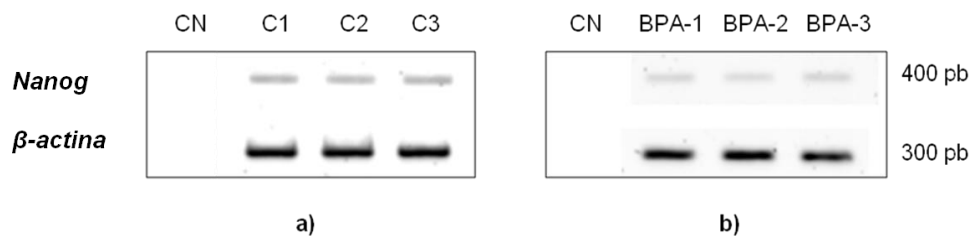


Figura 17. RT-PCR del gen *Nanog* en testículos de conejo de 15 dpp bajo el efecto del Bisfenol A. a) Grupo control, b) Grupo problema tratado con BPA dosis 50 mg/kg. La intensidad de las bandas obtenidas se correlaciona con la expresión del gen *Nanog*. No se observan diferencias notables en la expresión de *Nanog* en ambos grupos (CN: Control negativo de reacción).

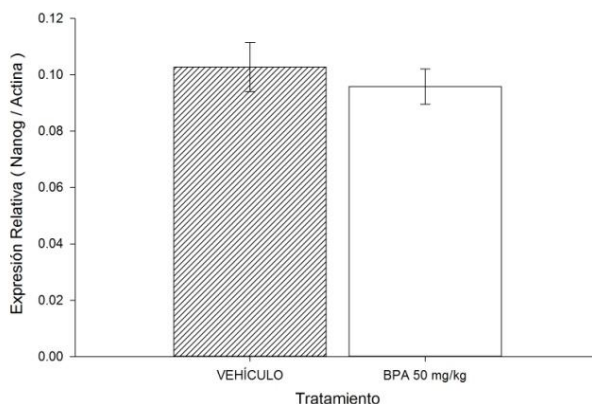


Figura 18. Efecto del BPA sobre la expresión del gen *Nanog* en testículos de conejo de 15 dpp. Los animales fueron tratados desde el nacimiento hasta los 10 dpp con 100 μ L de una dosis de BPA de 50 mg/kg vía subcutánea. El grupo control fue inyectado con 100 μ L del vehículo empleado (etanol 5%-aceite de maíz). Se trataron tres animales por grupo. Se sacrificaron a los 15 dpp y se obtuvieron las gónadas. La expresión del gen *Nanog* se evaluó mediante RT-PCR, realizándose la determinación por triplicado. La expresión relativa fue normalizada con la expresión de *β-actina*. La barra sombreada representa al grupo control tratado con el vehículo, mientras que la barra blanca constituye los datos obtenidos del grupo problema tratado con BPA 50 mg/kg. Los datos están graficados de acuerdo al error estándar (n=3). No se observa diferencia significativa en la expresión de *Nanog* entre ambos grupos ($p > 0.05$) con la prueba estadística de Anova.

VIII. DISCUSION

Existe vasta evidencia sobre la expresión de los genes de pluripotencia en la línea germinal durante el desarrollo embrionario y la etapa postnatal en el ratón. Este animal ha sido ampliamente estudiado y tomado como modelo debido a la existencia de cepas mutantes bien caracterizadas natural y experimentalmente. Además, desde un punto de vista práctico su corto periodo de gestación aunado a los bajos costos de mantenimiento han hecho del ratón el modelo ideal en comparación con otras especies (Costoya *et. al.*, 2004; Hobbs *et. al.*, 2010; Chambers, 2007).

Sin embargo, la caracterización de diferentes genes implicados en la determinación y diferenciación del linaje germinal durante el desarrollo gonadal en otros modelos animales es limitada. Permanecen poco exploradas las ventajas que podrían tener otras especies además del ratón, para la generación de conocimiento que permita correlaciones similares con los procesos que ocurren en el humano. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se investigó el perfil de expresión de uno de los genes maestros de pluripotencia, *Nanog*, en el testículo de conejos en etapa neonatal (recién nacido, 7 dpp, 16 dpp) y a los 3 mpp (Figura 14). El conejo fue elegido como modelo animal al poseer ciertas ventajas sobre el ratón, ya que el patrón de desarrollo gonadal es similar al humano en términos estructurales.

Encontramos que la expresión de *Nanog* del conejo se mantiene significativamente elevada al nacimiento, indicando que en esta etapa neonatal aún existe una población importante de células que no están totalmente diferenciadas. A los 7 dpp hay una disminución significativa en la expresión de *Nanog* en comparación de la detectada al nacimiento, la cual se acentúa al llegar a los 16 dpp. Este decremento se correlaciona con las poblaciones asincrónicas de gonocitos que van entrando al arresto mitótico. Asumiendo que en los gonocitos del conejo existe una correlación negativa entre la expresión de *Nanog* y la entrada en arresto mitótico, nuestros resultados sugieren que el arresto mitótico

se da de forma gradual en diversas poblaciones de gonocitos durante los primeros días del nacimiento. Al nacimiento, sólo una minoría de gonocitos están entrando en la fase G₀/G₁ de la mitosis. La población de células que van entrando en arresto mitótico se incrementa con el paso de los días; sin embargo, durante este periodo coexisten con gonocitos proliferando como ocurre en el testículo fetal del humano. En contraste con el ratón, donde dicho periodo es tan breve que la entrada de los gonocitos ocurre casi simultáneamente.

En especies de mayor talla con periodos prolongados de crecimiento y morfogénesis gonadal, en los que coexisten gonocitos proliferando, entrando en arresto mitótico e incluso algunos iniciando la meiosis, es posible que exista un microambiente somático heterogéneo involucrado en el comportamiento de los gonocitos. Así, el decremento gradual en la expresión de *Nanog* a partir del nacimiento hasta los 16 dpp coincide con la entrada en G₁/G₀ de los gonocitos (Figura 14).

En general nuestros resultados son similares a los niveles de expresión de *Nanog* reportados en el ratón. Sin embargo, hay diferencias espacio-temporales en el patrón de desarrollo gonadal entre el ratón y el conejo. La expresión de *Nanog* en el ratón es detectada en las Células Germinales Primordiales (CGPs) migratorias a los 7.75 y 8.0 días postcoito (dpc); dejan de proliferar y entran en arresto mitótico (en la fase G₀/G₁) entre los 13.5 y 15.5 dpc. Western y colaboradores (2008) reportan que entre los 12.5 y E14.5 dpc hay una reducción de *Nanog* en un 80%, que alcanza el 90% al llegar a la etapa a los 15.5 dpc. Por tanto, asumieron que *Nanog* es reprimido considerablemente durante el arresto mitótico (Yamaguchi *et al.* 2005). Sin embargo, una semana después del nacimiento los gonocitos del ratón reanudan su proliferación como espermatogonias migrando al centro de los cordones testiculares desde la membrana basal de los túbulos seminíferos. Los grupos de espermatogonias presentes durante los ciclos mitóticos en la etapa fetal y postnatal forman poblaciones sincronizadas, ya que se mantienen unidas mediante puentes citoplasmáticos originados por una citocinesis incompleta (Hermo *et al.*, 2010).

A diferencia del ratón, en el conejo las células germinales entran en meiosis después que el mesonefros adyacente ha sufrido regresión, por lo que se sugiere una fuente diferente de ácido retinoico (Díaz-Hernández *et al.*, resultados no publicados). Tanto la meiosis en los ovarios del conejo, como la entrada en arresto mitótico en los testículos de esta especie son procesos asincrónicos y asimétricos, lo cual coincide con los eventos que ocurren en el humano, y que difieren de los que ocurren en el ratón. En especies de mayor tamaño, el arresto mitótico de los gonocitos es un proceso asincrónico que coincide con la morfogénesis de los cordones seminíferos y la diferenciación del tejido estromático que incluye a las células de Leydig. Durante este periodo se establecen las diferentes poblaciones celulares que se originarán a partir de los gonocitos (Merchant-Larios y Díaz-Hernández, 2011). La mayoría serán espermatogonias que se diferenciarán para dar lugar a espermatozoides maduros, mientras que una pequeña población de gonocitos originarán células troncales pluripotentes (Herms *et al.*, 2010). Estas características de heterogeneidad y asincronía correlacionan positivamente con nuestros actuales resultados en los que la expresión de *Nanog* se da de manera gradual.

Además de la expresión de *Nanog* evaluada en la etapa neonatal en el conejo, se estudió a los 3 meses postparto (3 mpp), correspondiente a la etapa de adolescencia. Se detectó que la expresión relativa es muy baja en comparación de las determinadas al nacimiento y a los 7 dpp, y es muy similar a la observada en la entrada al arresto mitótico (16 dpp). En este periodo la expresión de *Nanog* aún no se reprime totalmente. Después que los gonocitos salen del arresto mitótico, grupos de ellos reinician la proliferación e inician el proceso de espermatogénesis. Sin embargo, existe una población remanente de células troncales que permanecen multipotentes y sostienen la producción de gametos durante toda la vida (Herms *et al.*, 2010). De manera que la discreta expresión detectada de *Nanog* podría corresponder al mantenimiento de la pluripotencia de éstas células. Además, existen reportes de que *Nanog* podría estar involucrado en los eventos epigenéticos en la espermatogénesis dada su interacción con complejos

corepresores que contienen desacetilasas de histonas activas (Liang *et. al.*, 2008; Kuijk *et. al.*, 2010).

Habiendo caracterizado el perfil de expresión del gen *Nanog* en testículos de conejo de diferentes edades, se decidió estudiar el efecto que podría ejercer un disruptor endócrino como el Bisfenol A en la etapa de 15 dpp, en la que la población de gonocitos entra en arresto mitótico.

Para estudiar el efecto del Bisfenol A se trataron gazapos con BPA a una dosis de 50 mg/kg de peso, la cual ha sido establecida como el valor LOAL (por sus siglas en inglés *Lowest Observed Affect Level*). Diversos autores han reportado en modelos de roedores que la exposición de BPA en etapa gestacional, neonatal o en lactancia a esta dosis o incluso por debajo de ésta tiene efectos importantes en el desarrollo embrionario a múltiples niveles, incluyendo alteraciones en las gónadas (Rubin, 2010).

Como se observa en la figura 15, después del primer día de tratamiento con BPA los gazapos presentaron lesiones tisulares en la zona de la inyección, asociando este efecto directamente al BPA, pues los animales control no presentaron dicho efecto. Este evento puede explicarse considerando que los receptores a estrógenos, uno de los blancos del BPA, se encuentran en diferentes tejidos e incluso en piel (Zalko *et. al.*, 2011).

Dado que las hormonas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de tejidos y la programación de células troncales en el desarrollo, los disruptores endócrinos pueden alterar el ambiente endócrino, ocasionando importantes efectos. Sin embargo, en el estudio de la expresión del gen *Nanog* en el testículo de conejo de 15 dpp bajo el esquema de tratamiento con BPA a una dosis de 50 mg/kg en el presente estudio, no arrojó diferencias significativas al compararlo con la expresión de este gen en el testículo de gazapos del grupo control.

Al analizar los resultados reportados publicados, se ha encontrado gran diversidad en los efectos del BPA dependiendo del modelo animal, la raza y el esquema de

administración incluyendo el periodo y tiempo de exposición, así como la dosis (Schugg *et. al.* 2011). Por esta razón, cabe la posibilidad de que la ausencia de diferencia significativa entre la expresión de *Nanog* en el testículo de conejo de 15 dpp en el grupo control y el grupo tratado con el BPA pueda estar relacionada con la dosis empleada, ya que los compuestos con actividad estrogénica como el BPA siguen una curva no monotónica por lo que pueden ejercer efectos a diferentes dosis (Taylor *et. al.*, 2011). Asimismo, es posible que la etapa postnatal y el esquema de administración al BPA utilizado en este estudio para observar el efecto en la expresión sobre *Nanog* en particular sea poco sensible.

Por otra parte, es importante destacar que si bien el tratamiento administrado con Bisfenol A en la etapa postnatal no arrojó cambios en la expresión de *Nanog* en los testículos de conejo de 15 dpp, es posible que efectos indirectos en este u otros genes de pluripotencia puedan vislumbrarse en etapas tardías de la vida adulta que no fueron evaluadas en el presente estudio. Considerando que la exposición al BPA en etapa fetal y neonatal puede influir en el desarrollo del aparato reproductor masculino, cuyas alteraciones se manifiestan en el adulto (Mendiola *et. al.*, 2010; Salian *et. al.*, 2009).

Dentro de los efectos reportados en la vida adulta en roedores expuestos al BPA en etapa neonatal se encuentran alteraciones en el movimiento de los espermatozoides y malformaciones en éstos, así como anomalías en el núcleo de las espermátidas en etapas 2-3 (Aikawa *et. al.*, 2004; Toyama *et. al.*, 2004), sugiriendo que este compuesto tiene un efecto directo sobre la espermatogénesis y consecuentemente en la fertilidad. Asimismo, se ha propuesto que la exposición al BPA en periodos susceptibles en el desarrollo podría contribuir en el desarrollo de neoplasias de la línea germinal en la vida adulta (Keri *et. al.*, 2007).

Esto implicaría que si bien no se obtuvo diferencia en la expresión del gen *Nanog* en el testículo de conejo en la edad de 15 dpp, no se debe descartar que en la

edad adulta se presenten alteraciones tanto en la expresión genética como a nivel funcional en este por efecto de un desequilibrio en el grupo de genes de pluripotencia que determinan el mantenimiento del pool de células troncales espermatogoniales. Aunado a esto, los datos existentes acerca de los efectos del BPA en el proceso de espermatogénesis y en la calidad de los espermatozoides (Aikawa *et. al.*, 2004; Toyama *et. al.*, 2004) permite suponer que en el conejo como modelo propuesto en este trabajo podría haber alteraciones similares que denoten un desequilibrio en el nicho de las células germinales, por lo que la evaluación futura de estos parámetros así como del posible desarrollo de neoplasias en el testículo del conejo es de suma importancia para entender de manera integral las modificaciones ocasionadas por el BPA.

El efecto que tiene el BPA sobre la expresión genética abarca una amplia variedad de genes que comienzan a vislumbrarse, y los cuales no solamente están involucrados en la pluripotencia, sino en otros procesos que no fueron objeto de estudio en el presente trabajo. Dentro de las aportaciones de Tainaka y colaboradores se encuentra la determinación de genes desregulados en el testículo de ratón cuyas madres fueron tratadas con BPA durante el día 7 al día 14 de la gestación, mediante el empleo de microarreglos específicos de testículo de ratón. De esta manera, empleando la base MeSH (*Medical Subject Headings*) interpretó los resultados obtenidos, determinando que el BPA altera la expresión de genes relacionados con las células de Sertoli (*Msilh*, *Ncoa1*, *Nid1*, *Hspb2* y *Gata6*). A pesar de que el modelo y esquema de tratamiento empleado por Tainaka y colaboradores es diferente al propuesto en este trabajo, es relevante mencionar que *Nanog* no aparece en el microarreglo como uno de los genes alterados en su expresión como consecuencia del tratamiento con este disruptor endócrino a pesar de que la exposición haya sido administrado en la etapa fetal, que representa el periodo de mayor vulnerabilidad. Esto podría sugerir que el efecto en la expresión genética ocasionada por este compuesto químico podría estar directamente asociada a la alteración de las células de Sertoli, y por tanto desequilibrar al nicho de las células germinales, por lo que podría tener efectos en

estas células de manera indirecta. Lo anterior es de relevancia ya que permitirá dirigir el estudio de las alteraciones genéticas en el testículo por efecto del BPA en el modelo del conejo propuesto en el presente trabajo hacia nuevas direcciones enfocadas a evaluar tanto células germinales como células de su nicho y no limitarlo sólo al grupo de genes de pluripotencia sino a otros genes que posibiliten comparar tanto el modelo del ratón como el de conejo como animales de experimentación y tener un conocimiento más sólido que permita la correlación e interpretación de los eventos que ocurren en el ser humano ante la exposición del BPA en etapas tempranas del desarrollo.

Aunque es relevante ahondar en el estudio de los cambios de expresión de *Nanog* y otros genes de pluripotencia en el testículo de conejo de 15 dpp para entender las posibles implicaciones a corto y largo plazo que permitan extrapolarlo con la exposición en humanos, es importante tener en cuenta que los cambios en los niveles de mRNA no son siempre indicativos de la magnitud de los cambios en la fisiología de los tejidos y del organismo en estudio.

Por tanto, a pesar de que el BPA no ejerce efectos sobre *Nanog* en el testículo de conejo de 15 dpp, es de suma relevancia esta determinación ya que no existen antecedentes sobre la influencia de este disruptor endócrino sobre dicho gen en la gónada del modelo animal propuesto en este trabajo, por lo que constituye un avance en el entendimiento del desarrollo gonadal del conejo y la influencia de compuestos con actividad estrogénica como el BPA en diferentes etapas de dicho proceso. En base a los datos reportados en la literatura, podría analizarse la expresión de *Nanog* bajo otro esquema de tratamiento empleando dosis más bajas de Bisfenol A que permitan analizar si el cambio de la expresión de este gen es dependiente de concentraciones específicas de este compuesto, así como investigar si la expresión de otros genes de pluripotencia se ve alterada por efecto del BPA tanto en células germinales como en células somáticas de la gónada.

IX. CONCLUSIONES

- La expresión del gen de pluripotencia *Nanog* en los testículos de conejo está altamente incrementada al nacimiento (0 dpp).
- La expresión de *Nanog* en los testículos de conejo disminuye gradual y significativamente de acuerdo con la edad, alcanzando los niveles más bajos durante la entrada asincrónica de los gonocitos al arresto mitótico (15-16 dpp).
- No hay cambios significativos entre la expresión relativa de *Nanog* en testículos de conejo de 16 dpp y en gónadas de 3 mpp.
- Los perfiles de expresión de *Nanog* determinados en el conejo correlacionan de una manera más certera con los eventos de desarrollo gonadal en el humano, en comparación con los del ratón.
- El Bisfenol A no modifica la expresión relativa del gen *Nanog* del testículo de conejo cuando los gonocitos entran en arresto mitótico.

X. BIBLIOGRAFIA

- Aikawa H., Koyama S., Matsuda M., *et. al.* Relief effect of vitamin A on the decreased motility of sperm and the increased incidence of malformed sperm in mice exposed neonatally to bisphenol A. *Cell Tissue Res.* 2004;315(1):119-124.
- Barker D.J. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br Med Bull.* 1997;53(1):96-108
- Bowles J. & Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development.* 2007; 134: 3401-3411.
- Brinster R.L. & Avarbock M.R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 11303–11307.
- Brinster R.L. & Zimmermann J.W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 11298–11302.
- Bullejos M. & Koopman P. Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Mol Reprod Dev.* 2004; 68: 422-428.
- Calvel P., Rolland A.D., Jégou B. *et. al.* Testicular postgenomics: targeting the regulation of spermatogenesis. 2010; 365: 1481-1500.
- Chambers I., Silva J., Colby D., *et. al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature.* 2007; 450:1230-1234.
- Clark A.T. The stem cell identity of testicular cancer. *Stem Cell Rev.* 2007; 3: 49-59.
- Clermont Y. & Leblond C.P. Renewal of spermatogonia in the rat. *Am. J. Anat.* 1953; 93: 475–501.
- Costoya J.A., Hobbs R.M., Barna M. *et. al.* Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet.* 2004; 36: 653-659.
- Dadoune J.P. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia. Histochem. Cytobiol.* 2007; 45: 141–147.
- Diaz-Hernandez V., Leon del Rio A., Zamora M., Merchant-Larios H. Expression Profiles of *SRY* and *SOX9* in Rabbit Gonads: The Classical Model of Mammalian Sex Differentiation. *Sex Dev* 2008; 2: 152–166.
- Fischer B., Chavatte-Palmer P., Viebahn C., *et. al.* Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction.* 2012;144(1):1-10.
- Hengstler J.G., Foth H., Gebel T., *et. al.* Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Crit Rev Toxicol.* 2011; 41: 263-291.
- Hermo I., Pelletier R.M., Cyr D.G., Smith C.E. Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. *Microscopy Research and Technique.* 2010; 73: 243–278.

- Hobbs M., Seandel M, Falciatori I, *et. al.* Plzf regulates germline progenitor self-renewal by opposing mTORC1. *Cell*. 2010. 6; 142(3): 468–479.
- Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 1971c; 169: 533–557.
- Keri R.A., Ho S.M., Hunt P.A., *et. al.* An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod Toxicol.* 2007; 24(2):240-252.
- Kluin P.M. & de Rooij D.G. A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Int. J. Androl.* 1981; 4: 475–493.
- Koopman P., Münsterberg A., Capel B., *et. al.* Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature.* 1990; 348(6300):450-452.
- Kostereva N. & Hofmann M.C. Regulation of the Spermatogonial Stem Cell Niche. *Reprod Domest Anim.* 2008;43: 386–392
- Koubova J., Menke D.B., Zhou Q., *et. al.* Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 21:2474-2479.
- Kuijk E.W., de Gier J., Lopes S.M., *et. al.* A distinct expression pattern in mammalian testes indicates a conserved role for NANOG in spermatogenesis. *PLoS One.* 2010; 5(6).
- Kurimoto K., Yabuta Y., Ohinata Y., *et. al.* Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev.* 2008;22(12):1617-1635
- Lagos-Cabré R., Moreno R.D. Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biol Res.* 2012; 45(1): 5-14.
- Liang J., Wan M., Zhang Y., *et. al.* Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2008; 10: 731–739.
- McCarrey J. Development of the germ cell. In *Cell and molecular biology of the testis* (eds C. Desjardins & L. Ewing). Oxford University Press. 1993, New York, NY. pp. 58–89
- McLaren A. & Southee D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol.* 1997; 187(1):107-113.
- Mendiola J., Jorgensen N., Andersson A.M., *et. al.* Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect.* 2010; 118: 1286-1291.
- Merchant-Larios H. & Díaz-Hernández V. Gonadal development. En Chimal-Monroy J. *Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis.* India: Transworld Research Network. 2011: 75-91.
- Molyneaux K. & Wylie C. Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol.* 2004; 48: 537-544.

- Monesi V. Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J. Cell Biol.* 1962; 14: 1–18.
- Morelli M.A. & Cohen P.E. Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 2005; 130:761-781.
- Nakatsuji N., Chuma S. Differentiation of mouse primordial germ cells into female or male germ cells. *Int J Dev Biol.* 2001; 45(3):541-548.
- Oakberg E.F. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.* 1971; 169: 515–531.
- Pan G. & Thomson J.A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research.* 2007; 17: 42-49.
- Phillips B., Gassei K., Orwig K.E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 27:1663-1678.
- Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update.* 2006; 12: 303-323.
- Rajpert-de Meyts E. & Hoei-Hansen C.E. From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1120:168-180.
- Reuter V.E. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Mod Pathol.* 2005; 18: 51-60.
- Rodríguez H.A., Santambrosio N., Santamaría C.G., *et al.* Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol.* 2010; 30(4):550-557.
- Roosen-Runge E.C. & Giesel Jr L.O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am. J. Anat.* 1950; 87: 1–30.
- Rubin B.S. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 127:27-34.
- Salian S., Doshi T., Vanage G. Perinatal exposure of rats to bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci.* 2009; 85:742-752
- Schug T.T., Janesick A., Blumberg B., Heindel J.J. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 127(3-5):204-215.
- Singh S.R., Burnicka-Turek O., Chauhan C., Hou S.X. Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *J Cell Mol Med.* 2011; 15: 468-483.
- Tainaka H., Takahashi H., Umezawa M., *et al.* Evaluation of the testicular toxicity of prenatal exposure to bisphenol A based on microarray analysis combined with MeSH annotation. *J Toxicol Sci.* 2012; 37(3):539-548.
- Taylor J.A., Richter C.A., Ruhlen R.L., *et al.* Estrogenic environmental chemicals and drugs: mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011; 127:83-95.
- Tegelenbosch R. A. & de Rooij D. G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat. Res.* 1993; 290: 193–200.

- Toyama Y. & Yuasa S. Effects of neonatal administration of 17beta-estradiol, beta-estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis. *Reprod Toxicol.* 2004;19(2):181-188.
- Tung P.S., Skinner M.K., Fritz I.B. Cooperativity between Sertoli cells and peritubular myoid cells in the formation of the basal lamina in the seminiferous tubule. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1984; 438: 435–446.
- U.S. EPA. Health and Environmental Effects Document on Bisphenol A. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH for the Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC. 1987
- Welshons W.V., Nagel S.C., vom Saal F.S. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology.* 2006; 147: 56-69.
- Western P.S., Miles D.C., van den Bergen J.A., *et. al.* Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells. *Stem Cells* 2008; 26: 339-347.
- Yabuta Y., Kurimoto K., Ohinata Y., *et. al.* Gene Expression Dynamics During Germline Specification in Mice Identified by Quantitative Single-Cell Gene Expression Profiling. *Biol Reprod.* 2006; 75: 705-716.
- Yamaguchi S., Kimura H., Tada M., *et. al.* Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns.* 2005; 5: 639-646.
- Yamaguchi S., Kurimoto K., Yabuta Y., *et. al.* Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development.* 2009; 136:4011-4020.
- Yoshida S., Sukeno M., Nakagawa T., *et. al.* The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development.* 2006; 133(8):1495-14505.
- Yuan H. & Yamashita Y.M. Germline stem cells: stems of the next generation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22:730–736.
- Zalko D., Jacques C., Duplan H., *et. al.* *Chemosphere.* Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. 2011; 82(3):424-430.