



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Efecto del bisfenol A sobre la maduración del ovocito a
través de la alteración en el cierre de las uniones Gap en el
complejo ovocito-células de la cúmula”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. DEYANIRA GUADALUPE ACUÑA HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de Toxicología

Directora de tesis: Dra. María Isabel Hernández Ochoa

Ciudad de México

JUNIO, 2018

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María Isabel Hernández Ochoa. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con los apoyos económicos por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de doctorado No 326699, otorgada a D.G.A.H. y del proyecto CB-2011/No.167678 (Otorgado a M.I.H.O).

RESUMEN

En los folículos preovulatorios, las células de la cúmula se comunican entre sí y con el ovocito a través de la comunicación mediada por uniones Gap (GJIC, por sus siglas en inglés: *Gap junction intercelular communication*) con el objetivo de nutrir al ovocito y mantener la meiosis arrestada en la profase I. El bisfenol a (BPA) es un monómero que forma parte de recipientes plásticos hechos con policarbonato. Se ha descrito que el BPA ocasiona alteraciones sobre la división meiótica en el ovocito, así como una disminución en la GJIC. Sin embargo, se desconoce si el efecto del BPA sobre las uniones Gap se relaciona con la división meiótica del ovocito. En este estudio investigamos si los efectos del BPA sobre la división meiótica de los ovocitos están relacionados con una disminución en la GJIC. Para cumplir con el objetivo, se realizó un cultivo primario de complejos ovocito-células de la cúmula (COC), los cuales se aislaron de folículos preovulatorios de ratones C57BL/6J. Los COCs se incubaron durante 2 h con BPA 0.22, 2.2, 22, 220 y 2200 nM. En algunos cultivos se realizó una incubación adicional de 16 h adicionando factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés: *Epidermal Growth Factor*) como estímulo de maduración para promover la reanudación meiótica y la progresión a metafase II (MII). Los resultados mostraron que, sin el estímulo de maduración, la exposición a BPA aumentó el porcentaje de ovocitos que reanudaron la meiosis y disminuyó la GJIC en los COCs sin modificar la expresión de los genes de las conexinas que forman los canales de uniones Gap (Cx43 y Cx37) ni la expresión de la proteína Cx43. Después del estímulo de maduración con EGF, el BPA mantuvo arrestados a los ovocitos en los estadios de anafase y telofase, disminuyendo el porcentaje de los ovocitos que culminaban la progresión y llegaban a MII. Al mismo tiempo, el BPA redujo la expansión de las células de la cúmula. La carbenoxolona, un inhibidor de la GJIC, y la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (un inhibidor de la expansión de las células de la cúmula) ejercieron efectos similares sobre la división meiótica de forma muy parecida al BPA. Los datos obtenidos en el estudio sugieren que la exposición a BPA acelera la progresión de la meiosis en el ovocito, lo que provoca

que se altere la progresión de la meiosis de profase I a MII, y estos efectos se relacionan directamente con una reducción en la GJIC en el COC.

ABSTRACT

In ovarian follicles, cumulus cells communicate with the oocyte through gap junction intercellular communication (GJIC), to nurture the oocyte and control its meiosis arrest in prophase I and division. Bisphenol A (BPA) is a monomer found in polycarbonate-made containers that can induce functional alterations, including impaired oocyte meiotic division and reduced molecule transfer in GJIC. However, how BPA alters oocyte meiotic division is unclear. We investigated whether BPA effects on oocyte meiotic division were correlated with reduced transfer in GJIC. Cumulus cell-oocyte complexes (COCs) isolated from mouse preovulatory follicles were cultured with 0, 0.22, 2.2, 22, 220, and 2,200 nM BPA for 2 h. An additional 6-h incubation with epidermal growth factor (EGF) was performed to promote the occurrence of meiotic resumption and progression to metaphase II. Without EGF stimulus, BPA treatment increased the percentage of oocytes undergoing meiotic resumption, decreased GJIC in the COCs, and did not modify GJIC genes (Cx43 and Cx37) and protein (CX43) expression. Following EGF stimulus, BPA increased the percentage of oocytes that remained at the anaphase and telophase stages, and decreased the percentage of oocytes reaching the metaphase II stage. Concomitantly, BPA reduced the expansion of cumulus cells. Carbenoxolone (a GJIC inhibitor) and 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (a cumulus cell-expansion inhibitor) exerted effects on meiotic division similar to those exerted by BPA. These data suggest that BPA accelerates meiotic progression, leading to impaired prophase I to- metaphase II transition, and that this adverse effect correlates with reduced bidirectional communication in the COC.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Ricardo, mi esposo y Verónica, mi hija, que son mi apoyo y motor para seguir adelante. ¡Los amo mucho!

En memoria a mi madre, Esther Hernández Medina (q.e.p.d.), que no pudo ver en vida la culminación de este proyecto. Sé que es motivo de orgullo para ella y lamento infinitamente que no pueda verlo con sus ojos.

¡Te extraño muchísimo má!

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, (Cinvestav), en especial al Departamento de Toxicología, por haberme permitido realizar mis estudios de maestría y doctorado en su programa de estudios.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca para realizar mis estudios de doctorado (No. 326699).

A la Dra. María Isabel Hernández Ochoa, directora de este proyecto de doctorado, por su apoyo incondicional, por la guía durante todo este tiempo, por brindarme su amistad y confianza y apoyarme en todo momento. ¡Muchas gracias Dra. Isabel!, la quiero y aprecio mucho.

A los miembros de mi comité de tesis, el Dr. Marcelino Hernández Valencia, el Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes, la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega y el Dr. Adolfo Sierra Santoyo, por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo de tesis, que sin duda lo mejoraron.

Al Colegio de Profesores del Área Biológica del CINVESTAV-IPN, principalmente a los profesores del Departamento de Toxicología, por las sugerencias y comentarios para realizar este trabajo.

A la Dra. Sihomara Patricia García Zepeda por su apoyo técnico en la estandarización y la cuantificación de los niveles de mRNA en las muestras, por medio de la técnica de qRT-PCR y por el apoyo para la obtención de las micrografías de la Figura 13.

Al Lic. Alfredo Alvarado Ramírez y al IBT David Christopher Ortiz Contla, por su valioso apoyo técnico.

Al Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales, LanSE, en particular a la sección de Microscopía Confocal y al M. en C. Iván José Galván Mendoza por su apoyo técnico en la estandarización de la técnica de GAP-FRAP y en la obtención de imágenes para la localización de conexinas en el COC.

A la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del Cinvestav (UPEAL). Al MVZ Ricardo Gaxiola Centeno por su apoyo técnico y por proporcionarme los animales necesarios para el desarrollo de mi proyecto, al MVZ Rafael Leyva Muñoz por su apoyo técnico y las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones de la UPEAL, al MVZ Benjamín Emmanuel Chávez Álvarez, MVZ Alberto Rojo García y C. René Pánfilo Morales por su apoyo técnico a lo largo del tiempo que duró mi proyecto.

A la C. María Teresa Hernández Moreno por su apoyo secretarial en la UPEAL.

A Patricia Cabrera Mata por el apoyo secretarial en el Departamento de Toxicología.

A Anallely Rosas Ocegueda y Lucina González de la Torre por el apoyo secretarial en la Coordinación Académica del Departamento de Toxicología.

A la M. en C. Elizabet Estrada Muñoz por el apoyo para estandarizar la técnica de cuantificación de AMPc.

A la M. en C. María de Jesús Solís Heredia por su apoyo técnico durante el tiempo que se usaron la incubadora y el microscopio de fluorescencia del laboratorio 5 del Departamento de Toxicología.

A la Dra. Emma Calderón por permitirme utilizar su microscopio invertido durante la estandarización del cultivo primario de COCs.

A la M. en C. Dolores Martín Tapia por su apoyo técnico para la estandarización y montaje de la técnica de inmunofluorescencia.

A la Biol. Josefina Poblano Bata por su apoyo en la cuantificación de Cx43 en el COC.

Al Dr. José Luna Muñoz, por su ayuda para la estandarización de la técnica de inmunofluorescencia de Cx43 en el COC.

Al M. en C. Ramsés Santacruz Márquez, por su apoyo incondicional durante la fase experimental de este proyecto y durante la elaboración del manuscrito

publicado ya que la imagen de la discusión es de su autoría. Además del apoyo académico, le agradezco su confianza y su amistad a lo largo de estos años.

A la M. en C. Yuliana Parra Forero por su apoyo para la obtención de las micrografías presentadas en la Figura 13.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 26, que ahora es 29, durante el tiempo que duró este proyecto: Ramsés, Gaby, Sihomara, Arlet, Rocío, Claudia, Itzel, Majo, Tonatiuh, Shirley, Brenda, Laura, Yuliana y Elim. Gracias por hacer amena la estancia en el laboratorio, por compartir muchos momentos de alegría y/o tristeza durante estos años. Como la integrante más longeva del laboratorio ¡les doy las gracias a todos!

A mis amigos de generación de maestría: Tania, Lety, Rocío, Derly, Isabel, Vicente, Benjamín, Érika, Lili y Theresia, por su apoyo incondicional durante estos años, la mayoría continuamos al doctorado y los años y experiencias compartidas son increíbles. Les agradezco mucho su amistad y ¡los quiero mucho a todos!

A Ramsés y Gaby (de nuevo) por su valiosa amistad y por permitirme ser parte de sus vidas y proyectos de maestría ¡los quiero muchísimo a los dos!

A Mariana Cárdenas por su amistad a lo largo de todo este tiempo, por compartir amenas y divertidas sobremesas.

A Omar Miranda y a la Dra. Isabel Hernández por su valiosísima amistad y su apoyo incondicional a lo largo de estos años que he pertenecido a la familia del Laboratorio 26 y ahora Laboratorio 29.

A mi madre Esther Hernández, por aceptar mis decisiones, apoyarme en todo momento y amarme sin reservas.

A Ricardo, mi esposo, por amarme y apoyarme durante todo este tiempo y a Vero, mi pequeñita que vino a cambiarme la perspectiva de vida que tenía, a hacerme más feliz y a iluminarme cada día que comparte conmigo. ¡Gracias por ser mi familia elegida, los amo muchísimo!

ÍNDICE

	Página
Resumen	ii
Abstract	iii
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
1	1
1.1	1
1.2	1
1.2.1	1
1.2.2	3
1.2.3	4
1.2.4	5
1.2.4.1	5
1.2.4.2	6
1.2.4.3	8
1.2.4.4	9
1.2.5	10
1.2.5.1	10
1.3	11
1.3.1	11
1.3.2	12
1.3.3	14
1.3.3.1	15
1.3.4	17
1.3.4.1	18
1.3.4.2	19
1.4	19
1.4.1	19
1.4.2	21
1.5	22
1.6	23
1.7	23
1.7.1	23
1.7.2	23
2	24
2.1	24
2.2	24
2.3	26
2.4	27
2.5	27
2.6	28
2.7	29

2.8	Evaluación de la maduración nuclear del ovocito	29
2.8.1.1.	Evaluación de la reanudación y progresión de la meiosis	30
2.8.1.2	Evaluación de la reanudación meiótica y progresión a MII	30
2.9	Ensayos de comunicación de uniones Gap en el COC	31
2.9.1	Análisis Gap-FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)	31
2.9.2	Ensayo de comunicación de uniones Gap hacia el ovocito	32
2.10	Localización de la conexina 43 por inmunofluorescencia	33
2.11	Expresión de ARN mensajero de las conexinas 37 y 43 en el COC	35
2.12	Análisis estadístico	35
3	Resultados	37
3.1	Efecto del Bisfenol A sobre la viabilidad de los ovocitos	37
3.2	Efecto del BPA sobre presencia de la ruptura de la vesícula germinal	38
3.3	Efecto del BPA sobre la progresión de la meiosis (fases de la meiosis desde prometafase I hasta MII)	39
3.4	Efecto del BPA sobre la formación del primer cuerpo polar durante la maduración del ovocito	41
3.5	Efecto de la exposición a BPA sobre la comunicación del COC mediada por uniones Gap	42
3.5.1	Comunicación hacia el ovocito (Conexina 37)	42
3.5.2	Comunicación entre las células de la cúmula (Conexina 43)	44
3.6	Comparación del efecto de la carbenoxolona entre la reanudación y la progresión de la meiosis	47
3.7	Efecto de la exposición a BPA sobre la expansión de las células de la cúmula y su relación con la progresión y la reanudación de la meiosis usando un inhibidor de la expansión	49
4	Discusión	51
4.1	Obtención de COCs a partir de folículos preovulatorios estimulados con hormona gonadotrofina coriónica equina (eCG)	51
4.2	Maduración de COCs murinos en cultivo primario estimulado con el factor de crecimiento epidermal (EGF)	52
4.3	Relevancia de las concentraciones de BPA y su posible mecanismo de acción a nivel molecular	54
4.4	Efecto del BPA sobre la reanudación (GVBD) y la progresión de la meiosis (de profase I a MII) del ovocito	55
4.5	Efecto del BPA sobre la comunicación mediada por uniones Gap en el COC y su relación con la progresión de la meiosis	57

4.6	Efecto del BPA sobre la expansión de las células de la cúmula	59
4.7	Respuesta no monótona del BPA	61
4.8	Consideraciones finales	63
5	Conclusiones	66
6	Perspectivas	67
7	Referencias	68
8	Anexo. Artículo científico producto de esta tesis	83

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Perfil fisicoquímico del BPA	2

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vías de biotransformación propuestas para el BPA en mamíferos de acuerdo a estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	7
2	Metabolismo del BPA	8
3	Estadios del desarrollo folicular	12
4	COCs antes y después de la expansión de las células de la cúmula	14
5	Uniones Gap	20
6	Diseño Experimental	25
7	Efecto de la exposición a BPA sobre la viabilidad de los ovocitos	37
8	Efecto de la exposición a BPA sobre la ruptura de la vesícula germinal	38
9	Efecto de la exposición a BPA sobre las fases de la reanudación de la meiosis en el ovocito	40
10	Efecto del BPA sobre la extrusión del primer cuerpo polar	41
11	Efecto de la exposición a BPA sobre la comunicación del ovocito mediada por uniones GAP y los niveles de ARNm de la conexina 37 (Cx37)	43
12	Efecto de la exposición a BPA sobre la comunicación del ovocito mediada por uniones GAP (Cx43)	45

13	Micrografías representativas de la inmunolocalización de Cx43 en células de la cúmula de COC incubados con BPA	46
14	Comparación del efecto de la carbenoxolona entre la reanudación y la progresión de la meiosis	48
15	Efecto de la exposición a BPA sobre la expansión de las células de la cúmula y su relación con la progresión y reanudación de la meiosis usando un inhibidor de la expansión	50
16	Modelo propuesto del efecto del BPA sobre la reanudación y progresión de la meiosis en el ovocito	65

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Mensajero del ácido ribonucleico
BPA	Bisfenol A
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca ⁺⁺	Calcio
CBX	Carbenoxolona
CICUAL	Comité de Investigación para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Cinvestav
COC	Complejo ovocito células de la cúmula
Cx37	Conexina 37
Cx43	Conexina 43
DES	Dietilestilbestrol
DON	6-Diazo-5-oxo-L-norleucina
eCG	Hormona gonadotropina coriónica equina
EE	Error estándar
EFSA	Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EPA	Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos de América
ESR	Receptor a estrógenos
ER1	Receptor a estrógenos uno
ER2	Receptor a estrógenos dos
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de América
FRAP	Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo
FSH	Hormona folículo estimulante

FSHR	Receptor a hormona folículo estimulante
GJIC	Comunicación intercelular mediada por uniones Gap
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GNRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GV	Vesícula germinal
GVBD	Ruptura de la vesícula germinal
hCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor a hormona luteinizante
LOAEL	Nivel más bajo de efectos adversos observables
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MII	Metafase II
NMDR	Dosis de respuesta no monotónica
NOAEL	Nivel de efectos adversos no observables
PDE3A	Fosfodiesterasa 3A
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
TDI	Ingesta diaria tolerable
UI	Unidades internacionales
UPEAL	Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Disruptores endócrinos

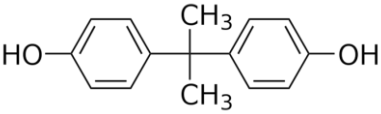
Se define a un disruptor endócrino como “un agente exógeno que interfiere con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo, las cuales son responsables del mantenimiento, homeostasis y regulación de procesos del desarrollo”. Estos compuestos pueden causar respuestas de tipo agonista y/o antagonista dependiendo de la hormona a la cual mimetizan (estrógenos, andrógenos, hormonas tiroideas, prolactina, insulina, etc.) (Wetherill y cols., 2007). Como resultado de su efecto, estos compuestos pueden afectar el crecimiento y la división celular. También se sabe que pueden alterar procesos metabólicos, neurológicos, inmunológicos y reproductivos en los diferentes seres vivos (vom Saal y Hughes, 2005).

1.2 Bisfenol A

1.2.1 Características generales y uso

El bisfenol A 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano (BPA) es un monómero formado por la combinación de dos equivalentes de fenol y un equivalente de acetona (Tabla 1) (Suzuki A y cols, 2002; vom Saal y Hughes, 2005; Vandenberg y cols., 2009). Se usa mayoritariamente como aditivo de plásticos de policarbonato para manufacturar una amplia gama de productos que incluyen biberones para bebé, botellas, garrafones para agua, contenedores de plástico para alimentos, cubiertos, platos y vasos desechables, equipo y tubería médica. También se utiliza como sellador dental y para el revestimiento de latas que contienen alimentos y bebidas (Suzuki y cols., 2002; Newbold y cols., 2007; Susiarjo y cols., 2007; Adewale y cols., 2009; Bondesson y cols., 2009; Vandenberg y cols., 2009). Debido a su amplio uso, el BPA se produce en grandes cantidades a nivel mundial y se ha estimado que la demanda de producción incrementa en un 6-10% por año (vom Saal y Hughes, 2005).

Tabla 1. Perfil fisicoquímico del BPA

Número de registro CAS	80-05-7
Estructura molecular	
Fórmula	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Peso molecular	228.287
Densidad	1.14-1.195 g/mL a 20° C-25° C
Constante de disociación pK _a	10.29 + 0.69
Coeficiente de partición octanol / agua, log K _{ow}	3.64 + 0.32
Factor de bioconcentración	220-344 ^a , 5.1-73.4 ^b
Solubilidad	120-300 mg/L a 25°C en agua y una gran solubilidad en soluciones alcalinas acuosas, alcohol y acetona
Constante de Henry-Law	4.0 x 10 ⁻¹ atm-cu m/mol a 25° C
Punto de ebullición	360.5° C a 760 mm Hg
Punto de fusión	153° C
Temperatura crítica y presión	Temperatura: 849 K, presión: 2.93 x 10 + 6 Pa
Calor de combustión	-7.465 J/kmol
Constante de velocidad de la reacción de radicales carboxilo	8.1 10 ⁻¹¹ cm ³ /molec-seg a 25° C
Presión de vapor	4.0 10 ⁻⁸ mm Hg a 25° C
Color y forma	Hojuelas de cristal de color blanco a crema, cristaliza en forma de prismas en ácido acético y como agujas en agua
Olor	Leve olor fenólico
Tiempo de vida media (días)	38 (agua), 75 (tierra), 340 (sedimento) y 0.2 (aire)

a Rango reportado por la US EPA (2012)

b Rango reportado por la US NIH Data Bank TOXNET.

Editado de Corrales y cols., 2015

1.2.2 Exposición a BPA en México

La población mexicana está expuesta a BPA a través de diversas fuentes de exposición como el consumo de alimentos y el uso de contenedores de plástico (Munguía-Lopez y cols., 2002; Cantonwine y cols., 2010; Gibson y cols., 2010; González-Castro y cols., 2011).

Específicamente, Munguía-Lopez y cols. (2002) evaluaron la migración del BPA de los revestimientos de algunas latas hacia su contenido (chiles jalapeños), ocasionada por el almacenamiento y la influencia de la temperatura, y observaron que hubo una migración de 15.33 µg/kg de BPA en latas almacenadas por 160 días a 35°C. González-Castro y cols. (2011) evaluaron la presencia del BPA en productos enlatados y en contenedores plásticos obtenidos en tiendas mexicanas de autoservicio; los autores detectaron concentraciones de BPA en un rango de 0.00001 – 0.021 µg/kg en productos enlatados como granos de elote, champiñones, chiles jalapeños, chícharos y zanahorias. Los autores también encontraron que los contenedores de plástico contenían BPA en un rango de 0.001 – 0.5 µg/kg de BPA en recipientes para microondas, botes plásticos para almacenar yogurt y crema y en biberones para bebé. Gibson y cols. (2010) evaluaron la cantidad de BPA que se acumula en el suelo de la zona agrícola del Valle de Tula en el Estado de Hidalgo, zona que es irrigada con aguas negras (no tratadas) provenientes de la Ciudad de México. Esta evaluación la realizaron adicionando agua no tratada a una columna con suelo agrícola y observaron que el 0 - 4.9% del BPA que se encuentra en el agua se incorpora al suelo; los investigadores estimaron que cada año se adicionan entre 2.2 y 9.8 µg de BPA por kg de masa seca de suelo regado con aguas negras en el Valle de Tula. Finalmente, Félix-Cañedo y cols. (2013) evaluaron la cantidad de BPA presente en fuentes de agua superficial y subterránea, así como agua de pozos, presas y tanques de almacenamiento que proveen de agua a la Ciudad de México y encontraron que, el BPA se presentó en concentraciones en un rango de concentración de 1-10 ng/L en todas las fuentes de agua evaluadas.

Últimamente se reportó un nuevo método analítico en el país para determinar concentraciones muy pequeñas de varios contaminantes emergentes en los que se incluyó al BPA, los autores lograron determinar concentraciones del compuesto en un rango de 0.8 a 2.7 ng/L (Salvatierra-Stamp y cols., 2015).

1.2.3 Fuentes y niveles de exposición

La principal fuente de exposición al BPA es por el consumo de alimentos y bebidas que hacen contacto con materiales que fueron manufacturados con este compuesto, debido a que las moléculas de BPA de los plásticos de policarbonato son fácilmente liberadas a través de la hidrólisis del grupo éster por acción de calor y/o detergentes (Bondesson y cols., 2009).

Los niveles de exposición a BPA que podrían ser seguros para la población de los Estados Unidos de Norteamérica aún son tema de controversia. La Agencia de Protección al Ambiente (EPA, *Environmental Protection Agency*, por sus siglas en inglés) ha establecido una ingesta diaria de 50 mg/kg/d de BPA que representa la dosis oral más baja a la que se observan efectos adversos (LOAEL: *lowest observed adverse effect level*). Es importante mencionar que para el BPA no se ha establecido la dosis a la cual no se observan efectos adversos (NOAEL: *non observed adverse effects level*), es por esta razón que la EPA ha utilizado la LOAEL para establecer 50 µg/kg/d como la dosis de referencia para el BPA. Esta concentración fue considerada por la EPA como segura para la exposición en humanos (vom Saal y Hughes, 2005; Adewale y cols., 2009). Sin embargo, algunos estudios establecieron que la dosis de 50 µg/kg/d de BPA es capaz de alterar funciones en el metabolismo de la glucosa y disminución de la fertilidad (Moore-Ambriz y cols., 2015; Villar-Pazos y cols., 2017).

Se ha descrito que los disruptores endócrinos, como el BPA, frecuentemente no siguen una curva dosis-respuesta monotónica y pueden ejercer efectos a concentraciones menores (Vandenberg y cols., 2012). Por lo tanto, El Centro para la Evaluación de Riesgos en la Reproducción Humana del Programa Nacional de Toxicología (NTP-CERHR, por sus siglas en inglés: *National*

Toxicology Program) ha planteado la necesidad de realizar estudios que incluyan la dosis de BPA de 50 µg/kg/d, para así establecer una evaluación del riesgo reproductivo por la exposición a dosis ambientalmente relevantes de este compuesto (CERHR, 2008).

Actualmente, la Unión Europea, por medio de la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés: *European Food Safety Authority*), tomando como base estudios de toxicidad realizados entre 2012 y 2016, ha bajado la ingesta diaria tolerable (TDI, por sus siglas en inglés: *Tolerable Daily Intake*) de BPA a 4 µg/kg/d (Gundert-Remy y cols., 2017). A pesar de que la TDI propuesta por la EFSA es casi 1/13 parte de la dosis de referencia de la EPA, existen estudios de toxicidad con concentraciones más bajas a la TDI de 4 µg/kg/d, por los que es necesario continuar con las evaluaciones de los efectos del BPA sobre los diferentes sistemas y órganos (Gundert-Remy y cols., 2017).

1.2.4 Toxicocinética

1.2.4.1 Absorción

La principal vía de absorción del BPA es la vía oral. Se ha estimado que el 99% del BPA que circula en el torrente sanguíneo proviene de la dieta. Por ello, diversos estudios se han enfocado a estimar la ingesta diaria de BPA en infantes y en adultos. En infantes de 1.5 a 6 años se ha estimado una ingesta diaria de 0.04-14.7 µg/kg/d. En niños y adolescentes de 7 a 19 años, el rango estimado de exposición diaria a BPA es de 0.36 a 0.55 µg/kg/d. En adultos se ha propuesto una ingesta aproximada diaria de 1.54 µg/kg/d a 500 µg/kg/d (CERHR, 2008). Estos datos sugieren que la exposición a BPA es común en toda la población y que, probablemente por los hábitos alimenticios, los adultos son quienes más expuestos están al compuesto.

1.2.4.2 Metabolismo

Existen rutas alternativas del metabolismo del BPA como la hidroxilación y la oxidación. Las reacciones de hidroxilación del BPA son catalizadas por la enzima citocromo peroxidasa que genera al metabolito 3-hidroxi-BPA que es convertido a BPA 3-4-quinona (BPAQ) por la misma enzima. Esta reacción puede revertirse (de BPAQ a 3-hidroxi-BPA) por la acción de la enzima citocromo reductasa (Atkinson y Roy, 1995; Edmonds y cols., 2004). El BPAQ, como otras orto-quinonas formadas después de la hidroxilación de un anillo aromático del estradiol o estrona, es capaz de formar aductos con el ADN en sistemas *in vivo* e *in vitro*. La unión covalente del BPAQ a las bases de ADN puede generar la hidrólisis de desoxirribosas y dar como resultado la pérdida de la base de la hebra de ADN (Edmonds y cols., 2004).

En general, se han descrito distintas vías de biotransformación para el BPA en mamíferos. Se ha descrito la formación de 4-isopropilhidroxifenol por la ruptura de la molécula, así como dímeros de BPA. También ha sido evidenciada la presencia de metabolitos hidroxilados como 2,2-bis(4-hidroxifenil)propanol o 3-hidroxibisfenol A (3-OH-BPA), formados por la acción de enzimas monooxigenasas (revisado en Michalowicz, 2014). De manera importante, en un estudio se observó la formación del 3,4-quinona bisfenol, así como su capacidad de formar enlaces con el ADN en presencia de peroxidases y contribuyendo de manera importante con la toxicidad del BPA (Atkinson y Roy, 1995). Otros metabolitos incluyen la formación de compuestos con mayor actividad estrogénica. El BPA se puede convertir a moléculas como 4-metil-2,4-bis(4-hidroxifenil)pent-1-ene, hidroquinona, 4-isopropilfenol e hidroxycumil alcohol gracias a la participación de enzimas como los citocromos, entre otras (revisado en Michalowicz, 2014). La figura 1 resume las vías de biotransformación del BPA propuestas en mamíferos.

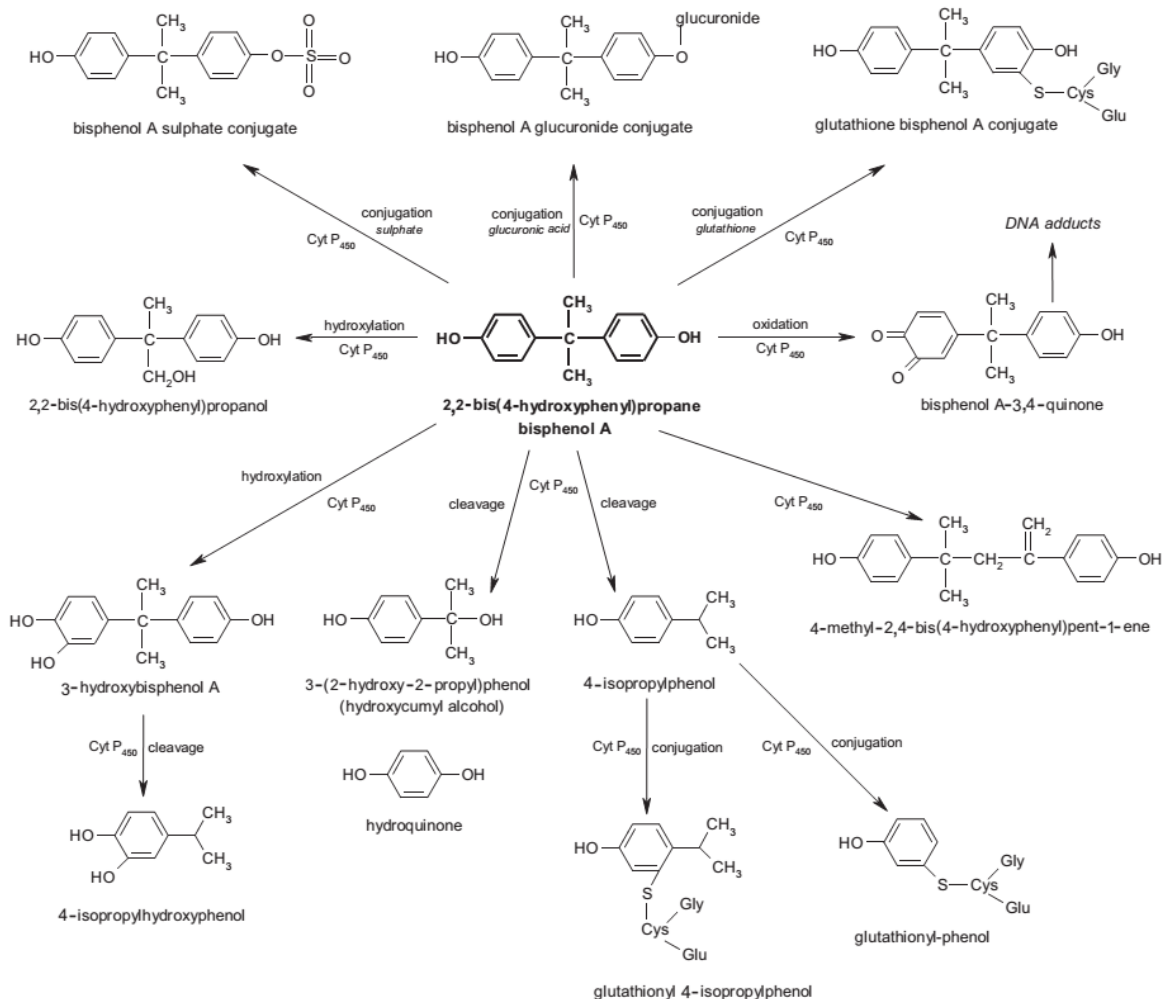


Figura 1. Vías de biotransformación propuestas para el BPA en mamíferos de acuerdo con estudios *in vivo* e *in vitro* (Michalowicz J, 2014).

El BPA que se absorbe pasa al hígado donde es metabolizado principalmente por medio de enzimas de fase II. Mediante la acción de diversas isoformas de la enzima uridin difosfato-glucuronosil transferasa (UGT), localizadas mayoritariamente en el tracto gastrointestinal y en el hígado, el BPA se metaboliza principalmente a glucurónido-BPA y en menor medida mediante las enzimas sulfotransferasas (SULTs), se transforma a sulfato-BPA (Pottenger y cols., 2000; Vandenberg y cols., 2009; FAO/WHO, 2010). En la figura 2 se ilustra la vía metabólica principal para el BPA, tanto en humanos como roedores. El monoglucurónido-BPA es rápidamente excretado principalmente

en la orina dentro de las primeras 24 h (FAO/WHO, 2010; Thayer y cols., 2015; Teeguarden y cols., 2015). Sin embargo, se ha descrito que la permanencia del compuesto en la forma de BPA libre puede prolongarse en el organismo debido a procesos de desconjugación por acción de enzimas β -glucuronidasas localizadas en el intestino (flora intestinal), en placenta e hígado fetal (Ginsberg y Rice, 2009).

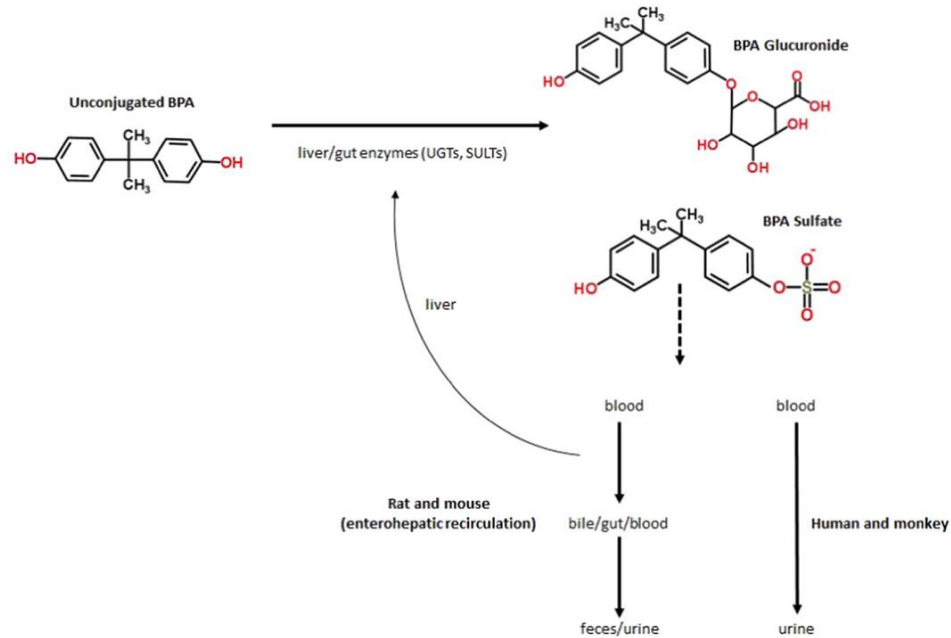


Figura 2. Metabolismo del BPA (tomado de Thayer y cols., 2015)

1.2.4.3 Distribución y acumulación

Después de ser absorbido, el BPA se distribuye a diversos tejidos. Völkel y cols. (2005) cuantificaron la concentración de BPA libre y conjugado en 6 voluntarios que tomaron 25 μ g de BPA en 50 ml de agua y observaron que el BPA conjugado se detectaba en orina aproximadamente 5 h después de la administración. Asimismo, Pottenger y cols. (2000) realizaron un estudio en ratas Fischer 344 administradas por vía oral con una sola dosis de ¹⁴C-BPA (100 mg/kg) y observaron que la concentración máxima en la sangre de los machos (0.22 μ g/g) se alcanzó a los 5 min post-administración; mientras que en hembras la concentración máxima (2.29 μ g/g) se observó a los 15 min post-

administración. Existen pocos estudios que hayan evaluado la acumulación del BPA en los tejidos. En un estudio se observó que la acumulación principal del BPA en tejidos como cerebro, gónadas, riñones, hígado, grasa peri renal, piel, útero y esqueleto se encontraba en una proporción de 0.37 – 0.60% del BPA, con respecto a la concentración de BPA en la sangre (Pottenger y cols., 2000). En otro estudio se encontraron niveles de BPA que oscilan entre 0.3 a 18.9 ng/mL en el plasma de mujeres embarazadas, mientras que en la placenta se encontraron niveles de BPA entre 1.0 y 104.9 ng/g, demostrando que el BPA puede ser distribuido incluso a los fetos (Schönfelder y cols., 2002). Esta información tan limitada indica que se requieren estudios adicionales que evalúen la acumulación del BPA en los diferentes órganos.

1.2.4.4 Eliminación

Algunos estudios han demostrado que el BPA se elimina a través de la orina y las heces fecales. Völkel y cols. (2005) llevaron a cabo una evaluación de la concentración de BPA y sus metabolitos en orina de humanos voluntarios (3 mujeres y 3 hombres) quienes recibieron una dosis única de BPA (25 µg) en agua de bebida. Los voluntarios proporcionaron muestras de orina y observaron que a las 5 h posteriores a la exposición se tuvo una recuperación de 85% en hombres y 75% en mujeres de BPA en forma conjugada. Pottenger y cols. (2000) realizaron un estudio toxicocinético con dos dosis de BPA en ratas (10 ó 100 mg ¹⁴C-BPA/kg administración única, por vía oral) y observaron que la eliminación fecal representaba la principal vía de eliminación del BPA, tanto del compuesto libre (que es el que causa efectos tóxicos) como de sus metabolitos. Kurebayashi y cols. (2003) administraron BPA a ratas macho Fischer 344 por vía oral (100 o 0.1 mg/kg) o intravenosa (0.1 mg/kg) y observaron que el BPA se elimina como glucurónido-BPA principalmente a través de las heces sin importar la vía de administración.

Recientemente otros estudios han mostrado resultados similares. En un estudio se evaluaron los niveles de BPA en su forma libre, así como sus

metabolitos principales (S-BPA y G-BPA) en muestras de orina de 6 mujeres y 8 hombres que voluntariamente ingirieron 100 µg/kg de BPA-deuterado (d6-BPA), encontrando que el BPA se puede encontrar en el suero en los primeros 5 min, alcanza una Cmax de 1711 ± 495 unidades, una Tmax de 1.1 ± 0.5 h y un tiempo de vida media de 6.4 ± 2.0 h (Thayer y cols, 2015). Este estudio mostró que hasta el 95.7% del BPA absorbido se elimina por la orina principalmente en su forma G-BPA (hasta 87%).

1.2.5 Toxicidad del BPA

Algunos estudios en animales de experimentación han descrito que el BPA puede estar implicado en problemas cardiovasculares, diabetes y obesidad, a través de mecanismos de alteración del metabolismo de la glucosa. También se ha descrito que este compuesto podría estar implicado en problemas de comportamiento (alteración en la actividad sexual), problemas del sistema nervioso por alteración de la regulación de los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico y en problemas en el sistema reproductivo masculino y femenino (Panzica y cols., 2007; Le y cols., 2008; Lubick, 2010; Newbold, 2010). Los efectos que se han observado a nivel del sistema reproductivo femenino son problemas a nivel uterino, como disminución del grosor del miometrio y aumento del grosor del epitelio uterino (Wetherill y cols., 2007). También se han observado efectos a nivel ovárico como alteraciones en el folículo periovulatorio debido a alteraciones en la meiosis del ovocito (Hunt y cols., 2003), alteración en la morfología del ovario y disminución de la fertilidad (Fernandez y cols., 2010).

1.2.5.1 Mecanismos de Toxicidad

Se ha descrito que el BPA posee afinidad por el receptor a estrógenos (ER; por sus siglas en inglés: *estrogen receptor*); sin embargo, su afinidad es muy baja ya que se une en una proporción de 1/10,000 con respecto al 17β-estradiol (Kuiper y cols., 1998). Los efectos del BPA sobre el ER dependen del

tipo de receptor al que se une; por ejemplo, se ha descrito que la unión del BPA con el ER- β (ER2) causa un efecto agonista, mientras que su unión al ER- α (ER1) causa efectos agonistas y antagonistas (Hiroi y cols., 1999). Estos antecedentes sugieren que la presencia del receptor ER1 en las células de la teca y del ER2 en las células de la granulosa en los folículos de ovario le confieren susceptibilidad al ovario para ser blanco de la acción del BPA. Sin embargo, los efectos resultantes podrían depender de la concentración del BPA.

Diversos efectos biológicos en diferentes tejidos han sido atribuidos a exposiciones a dosis bajas de BPA. Estudios en modelos *in vitro* han revelado una variedad de vías moleculares a través de las cuales el BPA puede generar respuestas celulares. El efecto primario del BPA como disruptor endócrino va más allá de su habilidad para mimetizar, promover o inhibir la actividad de los estrógenos endógenos y/o de alterar la acción del receptor nuclear a estrógenos e incluye también: los efectos sobre el sistema de andrógenos; alteración en el funcionamiento de las hormonas tiroideas; efectos sobre el desarrollo, diferenciación y función del sistema nervioso central, así como efectos sobre el sistema inmune (Wetherill y cols., 2007).

1.3 Aparato reproductor femenino

1.3.1 El ovario y su fisiología

El ovario es un órgano que está constituido por folículos y células del estroma. El folículo es la unidad estructural del ovario que se constituye de células germinales (ovocitos) y células somáticas (células de la granulosa y células de la teca). La función del ovario adulto está influenciada por la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), hormonas secretadas por la glándula hipófisis anterior bajo el control pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) proveniente del hipotálamo. Para ejercer sus efectos, la LH se une a su receptor (LHR) localizado en las células de la teca, mientras que la FSH se une a su receptor (FSHR) localizado en las células de la

granulosa. Las células de la teca poseen ER1 y las células de la granulosa poseen ER2. La funcionalidad de estos receptores es indispensable para las funciones del ovario tales como: ovulación, producción de estrógenos y ciclicidad (Richards y Pangas, 2010).

1.3.2 Desarrollo folicular (foliculogénesis) y maduración del complejo ovocito-células de la cúmula (COC)

Los diferentes estadios del desarrollo folicular se ilustran en la figura 3; durante la vida reproductiva media, algunos folículos primordiales crecen a folículos primarios que contienen un ovocito ligeramente más grande rodeado por una capa de células de la granulosa con forma de cubo. Los folículos primarios crecen al estado preantral, el cual es caracterizado por un ovocito rodeado de 2 a 4 capas de células de la granulosa y una capa de células de la teca. Los folículos preantrales crecen a folículos antrales y tienen la característica de poseer más de 4 capas de células de la granulosa, un espacio antral formado por el fluido folicular y una capa de células de la teca que delimita al folículo. Los folículos antrales son los encargados de sintetizar hormonas esteroideas como los estrógenos y andrógenos. Los estrógenos producidos por los folículos antrales estimulan la secreción de la FSH por parte de la hipófisis, la cual estimula el crecimiento del folículo antral a folículo preovulatorio (Hernández-Ochoa y cols., 2018).

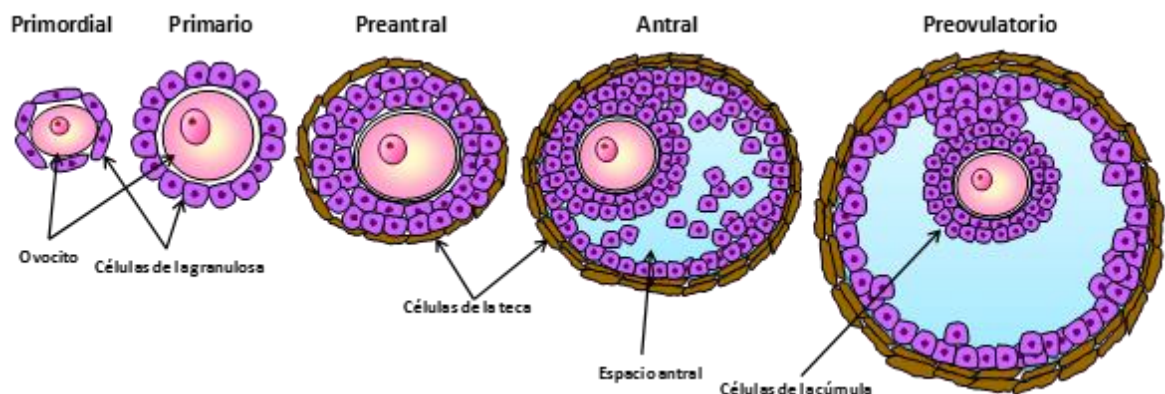


Figura 3: Estadios del desarrollo folicular (Hernández-Ochoa y cols., 2018).

Durante los estadios finales del desarrollo folicular, las células murales de la granulosa incrementan la síntesis de estrógenos, por lo que los niveles de estos en el suero se elevan significativamente. Este efecto ejerce una retroalimentación positiva sobre la pituitaria para incrementar la liberación de gonadotropinas, en particular de la LH, dando como resultado una descarga de LH. La unión de la LH a sus receptores localizados en las células murales de la granulosa se ven aumentados y esto activa las vías de señalización que promueven la maduración del ovocito. El incremento de la unión de la LH a su receptor, eventualmente, regula de forma negativa la vía esteroidogénica que permite la síntesis de estradiol y las células cambian la síntesis esteroidea hacia la producción de progesterona para la fase lútea. Bajo la influencia de la LH, los ovocitos primarios maduran a través de una compleja interacción entre las células foliculares y el ovocito, involucrando numerosas vías metabólicas (Hernández-Ochoa y cols., 2018).

En el folículo preovulatorio (Figura 3), las células de la granulosa que rodean al ovocito forman un nuevo linaje denominado células de la cúmula, las cuales forman, junto con el ovocito el complejo ovocito-células de la cúmula (COC, por sus siglas en inglés: *cumulus oocyte complex*) (Figura 4). Las células de la cúmula proveen al ovocito de nutrientes, nucleótidos, iones, etc., además, poseen receptores a FSH y reciben las señales que las células de la granulosa (células murales) le envían al ovocito durante la maduración y el proceso de ovulación (Hernández-Ochoa y cols., 2018).

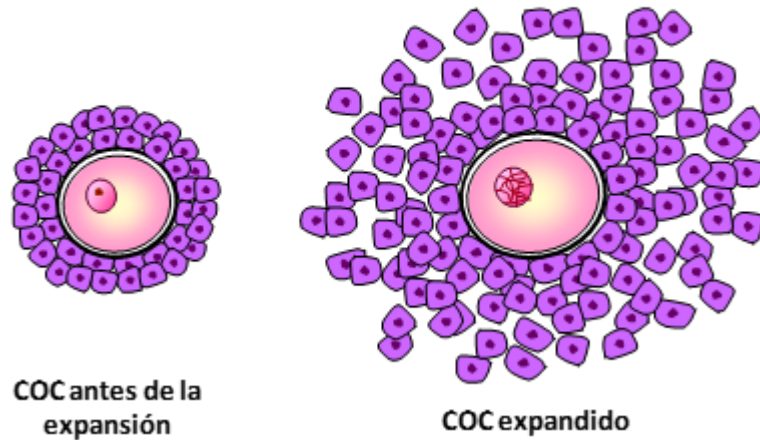


Figura 4. COCs antes y después de la expansión de las células de la cúmulo (Hernández-Ochoa y cols., 2018).

Como ya lo comentamos anteriormente, el COC es blanco del proceso denominado maduración del ovocito el cual prepara al ovocito para que, al ser liberado, tenga la capacidad de ser fertilizado y de desarrollar un cigoto. Dos de los principales procesos que involucra la maduración son: la progresión de la meiosis (maduración del núcleo) y la expansión de las células de la cúmulo.

1.3.3 La maduración del ovocito (reanudación y progresión de la meiosis)

La meiosis es un evento exclusivo de las células germinales, cuyo objetivo es la división de las células germinales para generar gametos femeninos y masculinos haploides a partir de células diploides ($2n$), estas células deben realizar dos divisiones celulares sucesivas para culminar con la producción de cuatro células haploides ($1n$). La meiosis se completa por medio de dos divisiones celulares (meiosis I y meiosis II). En la meiosis I, los miembros de cada par homólogo de cromosomas se distribuyen en diferentes núcleos y en la meiosis II, las cromátidas hermanas que formaban a cada cromosoma se separan y se distribuyen en los núcleos de las células hijas (Xu y cols., 2012).

1.3.3.1 Reanudación y progresión de la meiosis

La reanudación de la meiosis está dada por la ruptura de la vesícula germinal. Y después se da la progresión, desde la profase I, donde se encuentra arrestado el ovocito inmaduro, hasta la metafase II (MII) donde se libera el primer cuerpo polar y es arrestado nuevamente hasta la fertilización. Los estadios por los cuales avanza la meiosis son: profase I, metafase I, anafase I, telofase I y MII. La correcta congregación del material genético, así como la correcta posición de los cromosomas en el huso meiótico logran la maduración nuclear del ovocito, la cual es necesaria para que se lleve a cabo una fertilización exitosa. La profase I o prometafase I es el estadio de transición entre la ruptura de la vesícula germinal y la metafase I, morfológicamente presenta una forma de roseta. La metafase I es el estadio donde se lleva a cabo el reacomodo de los cromosomas ($2n$), los cuales se alinean en el ecuador del huso meiótico. El estadio de anafase I ($2n$) se presenta cuando los cromosomas, que se encuentran alineados y congregados en el huso meiótico, comienzan a separarse. El estadio de telofase I muestra a los cromosomas segregados en polos opuestos, es decir, que ya se llevó a cabo la separación del material nuclear ($2n$), una parte formará el primer cuerpo polar y la otra parte continuará con la meiosis en el ovocito. Finalmente, en el estadio de MII, los cromosomas ($1n$) se encuentran alineados de nuevo en el ecuador del huso meiótico y se observa la presencia del primer cuerpo polar (Xu y cols, 2012).

A nivel molecular, para poder llevar a cabo la maduración del ovocito y posteriormente su ovulación, el folículo preovulatorio debe recibir un estímulo detonante; en la mayoría de los mamíferos, este estímulo lo da la LH; en sistemas *in vitro*, este estímulo se da con sustancias como la LH, FSH y EGF (Gershon y cols., 2008). Para que el estímulo de la LH saque al ovocito del arresto meiótico, las células de la granulosa del folículo ovulatorio (células murales) reciben el estímulo de esta hormona, ya que disponen de receptores a la misma (LHR) y envían las señales al COC para dar inicio a la maduración.

Las células de la cúmula y el ovocito comienzan a enviar señales parácrinas entre sí para que se desencadene la progresión de la meiosis.

Por otro lado, para el arresto meiótico en el COC se requiere de la presencia y funcionamiento de las uniones Gap que son canales intercelulares formados por la unión de dos unidades proteicas (conexones) ubicados en cada célula que va a ser comunicada, las cuales mantienen el tráfico bidireccional de moléculas entre las células de la cúmula y el ovocito (Gershon y cols., 2008). Otros factores presentes en concentraciones importantes para mantener el arresto son el GMPc y el AMPc. Después del estímulo de la LH, la producción de AMPc aumenta a través de la adenilato ciclasa para estimular la actividad de las proteínas PKA y PKC, las cuales estimulan la producción de factores relacionados con el EGF en las células de la cúmula. Estos factores inducen la actividad de MAPK (por sus siglas en inglés: *mitogen-activated protein kinase*), responsables de fosforilar a las conexinas y cerrar las uniones Gap en el COC. Con el cierre de la comunicación mediada por uniones Gap en el COC se impide el libre tránsito del AMPc y el GMPc. La disminución de GMPc en el ovocito activa a la fosfodiesterasa 3A (PDE3A), la cual hidrolizará al AMPc, que al disminuir su concentración provocará que la PKA reduzca su actividad, se active la fosfatasa Cdc25b y se inactive la cinasa Weel/Myt, lo que resulta en la defosforilación de CDKI. Finalmente, esta defosforilación resulta en la activación del factor promotor de la meiosis (MPF, por sus siglas en inglés: *maturation promoting factor*), el cual es una serina-treonina cinasa compuesta por la cinasa dependiente de ciclina I (CDKI) y la ciclina B, lo que induce la salida del arresto meiótico (Tripathi y cols., 2010). Como parte de la reanudación de la meiosis, la activación de la MAPK en las células de la cúmula (no en el ovocito) da comienzo a la reorganización del huso meiótico. Primero, la MAPK interrumpe la GJIC al fosforilar a la Cx43, lo que promueve el cierre de las uniones Gap, posteriormente, la MAPK orquesta la reorganización de los microtúbulos y la posición del huso meiótico cerca de la corteza del ovocito (Sela-Abramovich y cols., 2006; Tripathi y cols., 2010).

1.3.4 Problemas de fertilidad femenina

Se define a la infertilidad como la dificultad de una pareja para concebir después de un año de coito sin protección. En las últimas décadas se ha observado un incremento en los problemas de fertilidad relacionados con alteraciones reproductivas femeninas. Las causas principales de infertilidad en los seres humanos están relacionadas con disfunción en la ovulación (15%), bloqueo o alteración en los oviductos (35%), anormalidades espermáticas (35%) y otras causas como anormalidad del útero, pólipos o causas sin explicación aparente (15%) (Case, 2003).

Estadísticas a nivel mundial reportan que 15 de cada 100 parejas presentan algún problema para procrear. La tasa de infertilidad en América Latina es del 3.1%. Actualmente existen en México 1.5 millones de casos de infertilidad según el INEGI, el 10% de las parejas son infértiles, 60% de estos problemas se relacionan con factores femeninos, 30% a los factores masculinos y 10% a factores relacionados con las dos personas que forman la pareja (Martínez-Núñez y cols., 2012).

En la Ciudad de México, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) atiende cada año 10 mil casos de infertilidad en el Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3 del Centro Médico La Raza, en donde dan atención a las mujeres y sus parejas. Los problemas reproductivos más comunes que se atienden están relacionados con alteraciones en la ovulación y con infecciones cérvico-vaginales que interrumpen la gestación (IMSS, 2018).

Los factores que contribuyen a la disfunción ovulatoria no se han establecido completamente, pero se ha descrito que la exposición a xenobióticos puede alterar la formación y/o desarrollo de los folículos y, en consecuencia, disminuir la fertilidad femenina (Sharara y cols., 1998). El grado de daño en la fertilidad depende del tipo de folículo que es blanco del xenobiótico (Sharara y cols., 1998; Hoyer, 2005). Cuando los folículos antrales son blanco puede ser causa de infertilidad temporal; sin embargo, si se afectan estadios foliculares del desarrollo temprano como los folículos primordiales y primarios, el resultado puede ser infertilidad irreversible debido a que estos tipos celulares son

irreemplazables (Hoyer, 2005). Por esta razón, es importante conocer los tipos celulares en el ovario que son blanco de efecto por la exposición a xenobióticos que pueden afectar la reproducción, como el BPA, y así proponer medidas de prevención.

1.3.4.1 Efecto del BPA en la fertilidad femenina

Como parte de las evaluaciones con dosis relevantes, los efectos de la exposición al BPA sobre el tracto reproductivo femenino han sido ampliamente estudiados en los últimos años, tanto en modelos animales y celulares como en la población humana (Hunt y cols., 2003; Mlynarcíková y cols., 2009; Machtinger y Orvieto, 2014; Moore-Ambriz y cols., 2015). En mujeres se ha asociado la exposición al BPA con el síndrome de ovario poliquístico, incidencia de abortos espontáneos, partos prematuros, afectaciones durante la maduración del ovocito y problemas en la fertilización e implantación del cigoto (Sugiura-Ogasawara y cols., 2005; Cantonwine y cols., 2010; Kandaraki y cols., 2011; Machtinger y cols., 2013). En modelos animales se ha reportado que la exposición al BPA provoca alteraciones en el ciclo estral, alteración en la foliculogénesis, disminución en la fertilización, alteración en la maduración del ovocito (meiosis) y presencia de aneuploidías (Hunt y cols., 2003; Can y cols., 2005; Susiarjo y cols., 2007; Eichenlaub-Ritter y cols., 2008; Varayoud y cols., 2011; Moore-Ambriz y cols., 2015).

Es importante recalcar que la exposición al BPA depende de los usos y costumbres que cada persona tenga, ya que el consumir alimentos y bebidas embotellados y/o enlatados, el reciclar envases de policarbonato, el uso de resinas dentales que contengan BPA, etc., incrementará la exposición al compuesto, promoviendo alteraciones varias en el organismo incluyendo las del tracto reproductivo. Además, la edad de la exposición al BPA es importante ya que la exposición en etapas críticas del desarrollo puede ocasionar problemas irreversibles, comparados con exposiciones temporales en la etapa adulta que pueden alterar parámetros cíclicos y cuyo daño puede revertirse.

1.3.4.2 Efecto del BPA sobre la maduración del ovocito

Existen diversos estudios donde se reporta un efecto del BPA sobre los parámetros que involucran a la maduración del ovocito (meiosis y expansión de las células de la cúmula). En un estudio que evaluó la expansión de las células de la cúmula en COCs porcino expuestos a 100 μM de BPA se observó una disminución en la expansión y una alteración en la formación de la matriz extracelular debida a un reacomodo del ácido hialurónico presente en el medio de cultivo (Mlynarcíkova y cols., 2009). Existen varios estudios que reportan que el BPA causa alteraciones en la reanudación y progresión de la meiosis, tanto en cultivos primarios, como en modelos *in vivo*; estos estudios han reportado fallas en la congregación de los cromosomas y en la formación del uso meiótico (Hunt y cols., 2003; Can y cols., 2005; Susiarjo y cols., 2007; Eichenlaub-Ritter y cols., 2008; Machtinger y cols., 2013; Wang y cols., 2016). Sin embargo, los potenciales mecanismos de toxicidad no son claros aún.

1.4 Uniones Gap

1.4.1 Estructura y función

Las conexinas son una gran familia de proteínas de membrana, se encuentran de forma ubicua en todos los organismos animales formando las uniones Gap que comunican a las células entre sí. Existen 20 tipos de conexinas en el ratón y 21 en el ser humano, son producidas por genes diferentes y varían mucho de tamaño entre sí. La estructura básica de las conexinas es la siguiente: tienen cuatro dominios de membrana, dos loops extracelulares, un loop citoplasmático, una terminación citoplasmática N y una C. Cabe señalar que los loops extracelulares son los encargados de formar los dominios de contacto que permiten la unión de las conexinas de conexiones de células adyacentes (Figura 5) (revisado en Kidder y Mhawi, 2002). La función que se les conoce mejor es la de formar canales membranales intercelulares de uniones Gap, que son estructuras que permiten compartir iones inorgánicos y pequeñas moléculas entre las células en un proceso conocido como comunicación celular mediada por uniones Gap (GJIC, por sus siglas en

inglés: *gap junctional intercellular communication*). Los canales se forman mediante la formación de un hemicanal en cada una de las células que se va a comunicar. Los hemicanales, también llamados conexones están formados por la unión de seis conexinas (Figura 5). Cuando el conexón de una célula se une con el conexón de otra se forma la unión Gap. De forma general, los conexones se presentan en la membrana celular en forma de densas placas con gran cantidad de ellos (Revisado en Winterhager y Kidder, 2015).

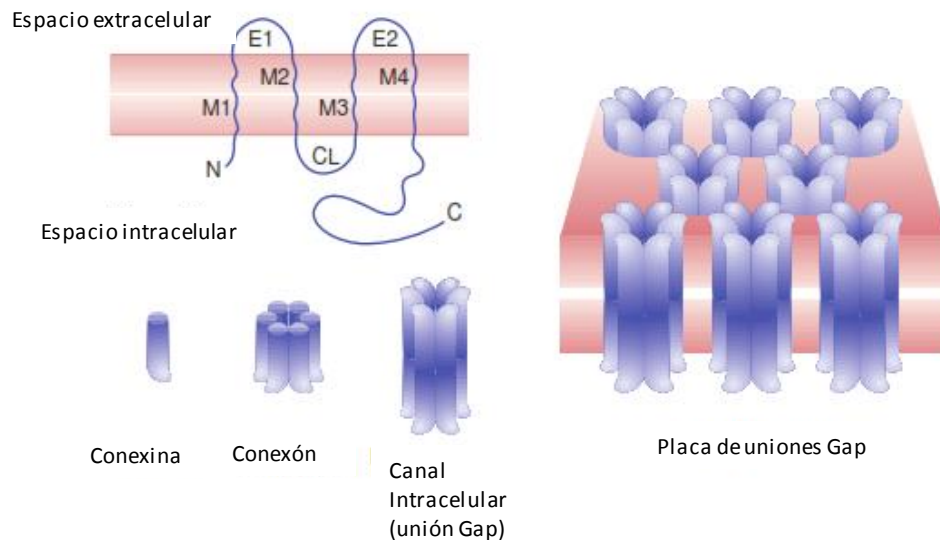


Figura 5. Uniones Gap (Modificado de Kidder y Mhawi, 2002)

Las conexinas que se encuentran de manera consistente en los folículos ováricos antrales de los mamíferos (incluidos el ratón y el ser humano) son la Cx37 y la Cx43. En los ovarios de ratón, la Cx37 se localiza formando conexones en la superficie del ovocito mientras que la Cx43 conecta a las células de la granulosa entre sí y a las células de la granulosa con el ovocito (Kidder y Mhawi, 2002).

Las células de la granulosa y posteriormente las células de la cúmula proveen al ovocito de nutrientes, iones, nucleótidos y otras moléculas a través de la GJIC. En sentido inverso, el ovocito envía señales moleculares a las células de la cúmula para mantener estables las concentraciones de AMPc y GMPc en el ovocito que forma parte del folículo antral. La GJIC permanece en el COC

mientras el folículo antral se encuentra en desarrollo y durante el reclutamiento folicular provocado por la FSH. Después del estímulo de LH, las conexinas son fosforiladas, lo que promueve el cierre del canal e impide el tráfico molecular, resultando en el desencadenamiento de la señalización para la reanudación y progresión de la meiosis en el ovocito (maduración nuclear) (Yokoo y Sato, 2004).

1.4.2 Efecto del BPA sobre las uniones Gap

La funcionalidad de las uniones Gap también ha sido evaluada después de una exposición a BPA. Se ha observado que el BPA altera la comunicación mediada por uniones Gap en cultivos celulares así como en un cultivo de células de glándula mamaria y de Sertoli (Lee y Rhee, 2007; Salian y cols., 2009), En el caso del efecto de BPA sobre las uniones Gap en ovocitos y COCs, se han observado alteraciones en las fluctuaciones de Ca^{++} (Mohri y Yoshida, 2005) ; alteración en la expresión de los genes de las conexinas y alteraciones en la cantidad de tráfico por las GJIC (Campen y cols., 2017) y el bloqueo reversible de los canales de las uniones Gap en ovocitos de *Xenopus* (Oh y cols., 2015).

Tomando como base la información anterior, no existen estudios que integren los efectos del BPA sobre los procesos de la maduración del ovocito (reanudación y progresión de la meiosis y expansión de las células de la cúmula) con el efecto sobre las uniones Gap y la GJIC que ejerce sobre diferentes tejidos como la glándula mamaria, tejido testicular y el folículo ovárico, principalmente el COC.

1.5 Justificación

En la vida moderna en la que nos encontramos inmersos, las mujeres en edad reproductiva son una población vulnerable ya que, el uso de envases plásticos y de latas cubiertas con policarbonato, que contiene BPA es muy común. Además, se sabe que los problemas de fertilidad han aumentado y los contaminantes ambientales juegan un papel importante ya que pueden mimetizar la función de algunas hormonas las cuales son detonantes de numerosos procesos reproductivos.

Se sabe que la exposición al BPA causa alteraciones de la función ovárica como problemas en la reanudación y progresión de la meiosis en el ovocito, esto da como resultado ovocitos de mala calidad, no competentes para ser fertilizados. De manera más específica, el BPA altera la reanudación y la progresión de la meiosis afectando la congregación de los cromosomas y la formación del huso meiótico. Además, se ha reportado la disminución en la expansión de las células de la cúmula causada por el BPA, y este es un parámetro de calidad del ovocito importante para que se lleve a cabo la fertilización del mismo.

También se ha observado que el BPA promueve el cierre de las uniones Gap, inhibiendo la GJIC en diferentes tejidos como el tejido de glándula mamaria y el testicular.

Por todo lo anterior es de nuestro interés relacionar el efecto de la exposición a BPA sobre el cierre de las uniones Gap en el COC, como un posible mecanismo que promueva la maduración del ovocito, evaluando el efecto sobre la maduración del núcleo (progresión y reanudación de la meiosis) y sobre la expansión de las células de la cúmula.

1.6 Hipótesis

La exposición a BPA durante la maduración del ovocito alterará la progresión de la meiosis a través de la modificación del momento del cierre de las uniones Gap en el COC.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo General

Determinar si el BPA altera la progresión de la meiosis durante la maduración del ovocito a través de un efecto sobre el cierre de las uniones Gap que comunican a las células de la cúmula entre sí, y con el ovocito.

1.7.2 Objetivos Particulares

- 1) Evaluar la citotoxicidad del BPA sobre los ovocitos de COCs murinos expuestos en un sistema *in vitro*.
- 2) Evaluar la expansión de las células de la cúmula alrededor del ovocito en COCs murinos expuestos a BPA en un sistema *in vitro*.
- 3) Evaluar la reanudación de la meiosis en COCs murinos expuestos a BPA en un sistema *in vitro* sin un estímulo de maduración.
- 4) Evaluar la progresión de la meiosis en COCs murinos expuestos a BPA en un sistema *in vitro* con un estímulo de maduración.
- 5) Evaluar el efecto del BPA sobre la función de las uniones Gap (Cx37 y Cx43) en el COC de ratón en un sistema *in vitro*.

2. MÉTODOS

2.1 Reactivos

El BPA (99% pureza), dietilestilbestrol (DES), dimetilsulfóxido (DMSO), Tritón X-100, Hoechst 22242, ioduro de propidio (IP), aceite mineral de calidad embrionaria (embryo-tested), PIPES, glicerol, cloruro de magnesio hexahidratado, insulina-transferrina-selenio (ITS), penicilina-estreptomicina (P/S), 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON), ethylene glicol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N-tetracetic acid (EGTA) y carbenoxolona (CBX) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La albúmina sérica bovina (BSA) fue comparada a Merck Millipore (Billerica, MA, USA). El medio de cultivo "minimum essential medium" (MEM)-GlutaMAX®-1 y el suero fetal bovino (SFB) fueron obtenidos de Gibco (Invitrogen, Carisbad, CA, USA). La hormona gonadotropina coriónica equina (eCG) fue obtenida de Intervet (Summit, NJ, USA). El Vectashield fue comprado a Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). El factor de crecimiento epidermal recombinante humano (EGF) fue obtenido de ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. (Rehovot, Israel). La Calceína-AM (39, 69-Di(O acetyl)-29, 79[N,N-bis (carboxymethyl)amino-methyl]-fluorescein, tetraacetoxy methyl ester) fue comprado de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). El kit RNeasy Mini Kit fue obtenido de Qiagen (Hidden, Alemania). El kit iScript cDNA synthesis fue obtenido de Bio-Rad (Hercules, CA, USA), Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix fue comprado de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). El anticuerpo primario anti-conexina 43 (H-150) fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology Inc. (California USA). El anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 Donkey anti-rabbit IgG fue obtenido de Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA).

2.2 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en el presente estudio se muestra en la Figura 6.

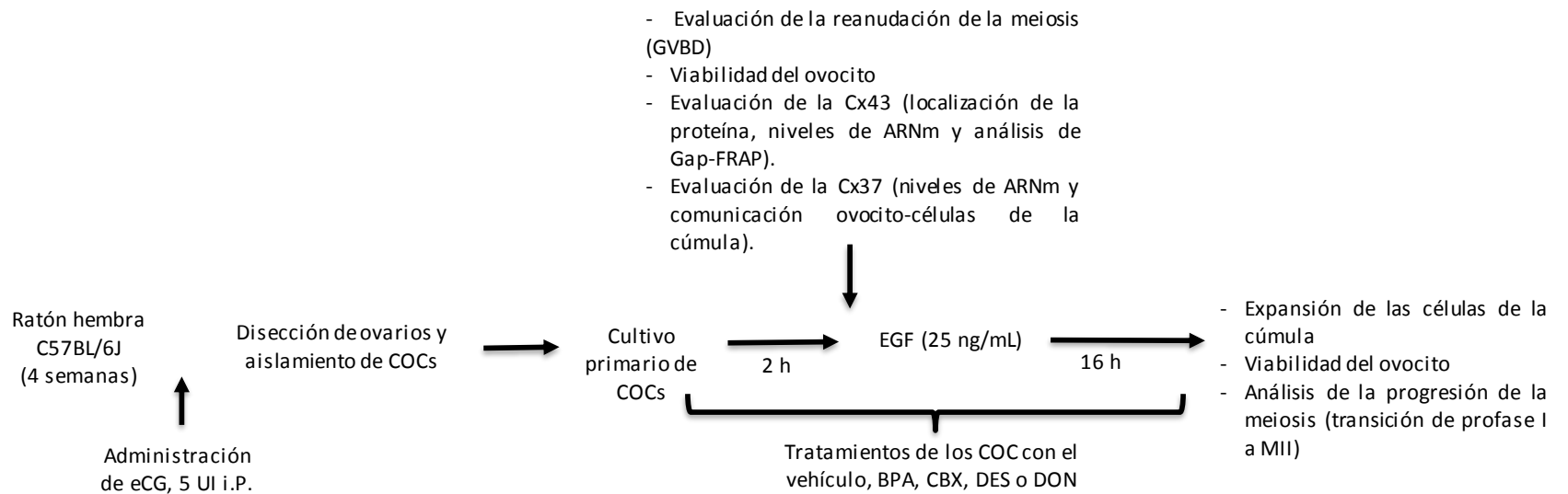


Figura 6. Diseño experimental. eCG, gonadotropina coriónica equina; i.p., intraperitoneal; GVBD, ruptura de la vesícula germinal; Cx43, conexina 43; Cx37, conexina 37; COC, complejo ovocito células de la cúmula; EGF, factor de crecimiento epidérmico; BPA, bisfenol A; CBX, carbenoxolona; DES, Dietilestilbestrol; DON, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina; MII, metafase II.

2.3 Preparación de soluciones

Las soluciones stock de BPA y DES (20 mM y 10 mM respectivamente) fueron preparadas en DMSO como disolvente. Las soluciones de trabajo de BPA (5, 50, 500 y 5000 μ M) y de DES (0.5 mM) también fueron preparadas en DMSO. Cada solución de trabajo fue disuelta en medio de cultivo el día que se realizó cada experimento para obtener las concentraciones finales de 0.2, 2, 22, 220 y 2200 nM de BPA y 37 nM de DES en el cultivo. La concentración de DMSO nunca excedió el 0.1% en los diferentes cultivos. La concentración de 220 nM de BPA es equivalente a la dosis reportada como la dosis de referencia segura para consumo humano (50 μ g/kg/d) por la EPA en USA (U:S: Environmental Protection Agency, 1988). La concentración de DES 37 nM (equivalente a 10 μ g/kg/d) fue seleccionada porque ha sido reportada como causa de toxicidad en el sistema reproductivo femenino (Moore-Ambriz y cols., 2015). Se utilizaron los controles positivos DON 1 mM para la evaluación de expansión de las células de la cúmula o CBX 200 μ M para las evaluaciones de GJIC. El DON se diluyó primero en agua deionizada (29.21 mM) y posteriormente se diluyó en MEM-GlutaMAX $\text{\textcircled{R}}$ -1 para obtener la solución de trabajo. La CBX también se diluyó primero en agua deionizada para formar una solución stock de 10mg/mL (16.26 mM), posteriormente se llevó al volumen de la solución de trabajo en medio MEM-GlutaMAX $\text{\textcircled{R}}$ -1.

Cabe señalar que el objetivo de usar los tres controles positivos (DES, DON y CBX) fue el siguiente:

- a) El DES es considerado un disruptor endócrino altamente estrogénico que mimetiza las funciones “estrogénicas” que pueda ejercer el BPA en nuestro sistema;
- b) el DON es un inhibidor de la síntesis de ácido hialurónico y su función en nuestro sistema fue inhibir la expansión de las células de la cúmula
- c) la CBX es conocida por su capacidad de bloquear la comunicación entre las uniones Gap. Los tres controles apoyaron las hipótesis del comportamiento (efecto) del BPA en el proceso fisiológico estudiado.

2.4 Animales

Para este estudio se eligió a la cepa de ratones C57BL/6J debido a que presenta mayor sensibilidad a los compuestos estrogénicos comparados con otras cepas como la CD-1 (Spearow y cols., 1999; Pepling y cols., 2010). Estas diferencias en la sensibilidad a los compuestos estrogénicos han sido atribuidas a variaciones genéticas de la cepa elegida con respecto a otras (Spearow y cols., 1999). Se utilizaron ratones hembra inmaduras (4 semanas de edad) las cuales fueron obtenidas de la colonia de reproducción del bioterio del Cinvestav-IPN. Los animales fueron alojados en cajas de polisulfonato con filtro y mantenidas en el bioterio con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, a una temperatura constante de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 50% de humedad relativa y alimentación y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados en los ratones se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos internacionales establecidos para el uso y el cuidado de los animales de laboratorio. Estos procedimientos se llevaron a cabo previa autorización del Comité de Investigación para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV-IPN (CICUAL) y de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL; protocolo número 0147-15)

2.5 Cultivo de COCs

Ratones hembra de la cepa C57BL/6J de aproximadamente 30 días de edad fueron sacrificadas por dislocación cervical 48 h después de inyectarse 5 UI de hCG por vía intraperitoneal. Los ovarios fueron disecados y puestos en cajas de Petri con medio MEM α . Los folículos preovulatorios (400 μm) fueron puncionados con pinzas de relojero del número #5 con el objetivo de liberar el COC. Para realizar los cultivos, los COCs fueron colocados en gotas de 20 μl (12-15 COCs por gota) de MEM-GlutaMAX $^{\text{®}}$ suplementado con 5% SFB, 1% ITS y 1% P/S. Las soluciones de trabajo del BPA, DES, DON o CBX se adicionaron a los medios en los volúmenes adecuados para obtener las concentraciones deseadas. El MEM-GlutaMAX $^{\text{®}}$ con DMSO (0.1%) fue usado como control negativo. Todas las gotas de medio con el cultivo primario de los

COCs fueron cubiertas con aceite mineral para cultivo embrionario e incubados dentro de una cámara húmeda a 37°C con 5% de CO₂. Después de esta incubación, se llevaron a cabo las siguientes evaluaciones con los COCs:

- a) Evaluación de la expansión de las células de la cúmula.
- b) Evaluación de la viabilidad de los ovocitos.
- c) Evaluación de la progresión de la meiosis.
- d) Evaluación de la localización de uniones Gap.

2.6 Viabilidad del ovocito

2.6.1 Principio

La viabilidad celular es el primer parámetro que se utiliza para evaluar el efecto tóxico de un compuesto. La muerte de las células puede ser observada mediante colorantes que ingresan a las células debido a cambios en su morfología o en procesos enzimáticos que permiten el acceso e incorporación de los diferentes pigmentos.

2.6.2 Procedimiento

Después de realizar la incubación de 2 h y la de 16 h con el estímulo de maduración, las células de la cúmula fueron retiradas de los COCs con 15 mg/ml de hialuronidasa durante 12 min, también se realizó pipeteo de forma delicada para realizar una mejor remoción de las células de la cúmula. Después de la inoculación con hialuronidasa, los ovocitos fueron lavados con medio y se incubaron con ioduro de propidio (10 µg/ml) por 10 min seguido de una segunda incubación con Hoechst 33342 (10 µg/ml) por 10 min. Finalmente, los ovocitos teñidos fueron montados en portaobjetos con glicerol 90% y sellados con esmalte para evitar la deshidratación de la muestra.

2.7 Expansión de las células de la cúmula

2.7.1 Principio

La evaluación de la expansión de las células de la cúmula es un parámetro que evalúa la maduración del ovocito. Después del estímulo de maduración, las células de la cúmula comienzan a separarse debido a la incorporación de moléculas secretadas por ellas mismas y provenientes del fluido folicular con el objetivo de formar una matriz extracelular donde se encuentren embebidas para que el COC pueda moverse libremente a través del oviducto.

2.7.2 Procedimiento

Para llevar a cabo esta evaluación, se obtuvieron imágenes de los COCs antes y después del estímulo con EGF, usando una cámara (Lumenera, Ottawa, ON, Canadá) conectada a un microscopio estereoscópico (Olympus SZ61; Tokio, Japón). La expansión de las células de la cúmula fue analizada de las imágenes obtenidas con el software Image Pro Premier v 9.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). La diferencia entre las áreas de la segunda y primera medidas, correspondiente al antes y después de la expansión, fue considerada como el total de la expansión por cada COC.

2.8 Evaluación de la maduración nuclear del ovocito

2.8.1 Principio

La evaluación de la maduración nuclear del ovocito se realiza tomando como referencia las características morfológicas de las diferentes etapas de la meiosis por las que atraviesa este gameto. De forma general, la evaluación se realiza con ayuda de tinciones que marcan el material nuclear del ovocito. La reanudación de la meiosis en el ovocito, el cual se encuentra arrestado en la profase I (PI) y reanuda la meiosis después del estímulo de maduración y progresa hasta la metafase II (MII). Los diferentes estadios de la maduración de la meiosis son: vesícula germinal (VG), ruptura de la vesícula germinal (GVBD), metafase I (MI), anafase-telofase I (A/T I), metafase II (MII)

2.8.1.1 Evaluación de la reanudación y progresión de la meiosis

2.8.1.1.1 Procedimiento

Para evaluar la reanudación meiótica, los COCs tratados con BPA fueron inmediatamente transferidos a gotas de medio MEM-GlutaMAX® para ser lavados, posteriormente se incubaron con hialuronidasa al 1% por 10 min para desnudar a los ovocitos. Después, los ovocitos fueron montados sobre laminillas gelatinizadas y transferidos a gotas con un amortiguador estabilizador de microtúbulos (0.1 M PIPES, 2.5 mM EGTA y 5 mM MgCl₂) conteniendo 1% de tritón y 2% de formaldehído por 30 min. Después de 3 lavados con MEM-GlutaMAX®, los ovocitos fueron incubados con IP por 10 min y después fueron montados usando Vectashield® y un cubreobjetos.

2.8.1.2 Evaluación de la reanudación meiótica y progresión a MII

2.8.1.2.1 Procedimiento

La evaluación de la reanudación y progresión de la meiosis se realizó con base en la clasificación utilizada por Xu y cols. (2012) y Huang y cols. (2016). Para cada tratamiento se realizó la evaluación en porcentajes del estadio meiótico en el que se observó a cada ovocito.

Un ovocito en estadio de vesícula germinal (GV) se caracteriza morfológicamente por la presencia del material nuclear descondensado y se considera arrestado en profase I. Un ovocito en estadio GVBD, el cual se caracteriza morfológicamente por la presencia de cromosomas organizados en forma de "roseta" (diploide, 2n), se considera que ha reanudado la meiosis (Dekel, 2005).

Para evaluar la progresión de la meiosis, se adicionaron 25 ng/mL de EGF a cada gota de medio conteniendo COCs pretratados con BPA; a las 16 h post-estímulo, los ovocitos se desnudaron con hialuronidasa 1% y se tiñeron con ioduro de propidio como se describió arriba. La incubación con EGF por 16 h se realizó para mimetizar el estímulo de la LH y promover la reanudación de la meiosis y la progresión de la misma de profase I a MII (maduración nuclear) (Hsieh y cols., 2007; Ritter y cols., 2015). Se consideró un ovocito en estadio

de prometafase (PM) cuando presentaba una morfología similar a la GVBD (forma de roseta). Un ovocito en estadio de metafase I (MI) presentó una morfología con los cromosomas alineados en un huso meiótico ($2n$). Se consideró a un ovocito en estadio de anafase I (AI) cuando los cromosomas comenzaban a separarse. Un ovocito en estadio de telofase I (TI) se observó con la segregación de cromosomas a los polos opuestos ($2n$). Se consideró a un ovocito en estadio de MII cuando los cromosomas se alinearon de nuevo en el huso meiótico ($1n$) aunado a la presencia del primer cuerpo polar (célula haploide).

2.9 Ensayos de comunicación de uniones Gap en el COC

2.9.1 Análisis Gap-FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*)

2.9.1.1 Principio

La evaluación de la GJIC en el ovocito durante la maduración *in vitro* es un ensayo descrito por Santiquet y cols. (2012) que consiste en la evaluación de las GJIC entre las células de la cúmula al incubar el COC con calceína-AM. El grupo acetometoxil (AM) acoplado a la calceína le proporciona características altamente lipofílicas para permear rápidamente a través de las membranas de células vivas hasta llegar al citoplasma. Una vez dentro, la calceína es hidrolizada por las esterasas endógenas que rompen el enlace del grupo acetometoxil (AM), dejando libre a la calceína impermeable a la membrana que al ser excitada a una longitud de onda de 495 nm emite fluorescencia verde a 515 nm. El método de Gap-Frap consiste en realizar un fotoblanqueo en 3-4 células con un láser de argón y posteriormente se evalúa el tiempo en el que la célula fotoblanqueada recupera la fluorescencia, la cual es provista desde otras células con las que tienen comunicación por uniones Gap. El monitoreo de la redistribución del fluorocromo se puede evaluar como una curva de recuperación en función del tiempo (Wade y cols., 1986).

2.9.1.2 Procedimiento

La comunicación a través de las uniones Gap (GJIC) fue analizada usando un ensayo de Gap-FRAP de acuerdo al realizado por Ratchford y cols. (2008) y Santiquet y cols. (2012). La molécula calceína-AM fue utilizada porque su fluorescencia se observa sólo en células vivas y la transferencia de la fluorescencia de una célula a otra depende de la propia GJIC ya que, las esterases de las células rompen en enlace de la calceína con el "AM", lo cual impide que la molécula fluorescente salga de la célula a través de difusión pasiva y sólo pueda pasar de una célula a otra a través de las uniones Gap (Ratchford y cols., 2008). Brevemente, después de la exposición a BPA, los COCs fueron incubados por 25 min con 1 μ M de calceína-AM en medio de cultivo con 0.2% de BSA con la intención de que el medio se transfiriera a través de las células del COC. Para evaluar la GJIC entre las células de la cúmula, se realizó un fotoblanqueo de 3 a 5 regiones del COC, que se localizan en el centro del aglomerado de las células de la cúmula. El fotoblanqueo se realizó utilizando un láser pulsátil (100%) y un microscopio confocal (Leica TCS-SP5-MOsegundo Wetzlar, Alemania). La intensidad de la fluorescencia, antes y después del blanqueo, fue monitoreada con una serie de imágenes continuas que se capturaron cada 30 seg en un lapso de 10 min con apoyo del microscopio confocal. Los datos se presentan como la media de la recuperación de la fluorescencia de 3-5 regiones (de al menos 3 COCs por tratamiento en al menos 3 experimentos independientes) después de haber blanqueado el área seleccionada.

2.9.2 Ensayo de comunicación de uniones Gap hacia el ovocito

2.9.2.1 Principio

El principio es el mismo que el ensayo Gap-FRAP al utilizar a la calceína-AM, la cual se utiliza en este ensayo para que sea transportada de las CC hacia el ovocito. Después de retirar las células de la cúmula que rodean al ovocito, éste puede ser evaluado en un microscopio de fluorescencia y la intensidad de la

marca puede ser cuantificada mediante un software en un lapso breve (30 min).

2.9.2.2 Procedimiento

La GJIC entre las células de la cúmula y ovocitos fue analizada usando el ensayo de comunicación de uniones Gap en el COC de acuerdo con Sasseville y cols. (2009) con leves modificaciones. Brevemente, de 10 a 15 COCs fueron incubados en presencia de calceína-AM por 15 min. Se realizó una segunda incubación con MEM solo para permitir que la calceína-AM se transfiriera de las células de la cúmula al ovocito. Después de la transferencia de la molécula fluorescente, las células de la cúmula fueron removidas del ovocito con un pipeteo suave. La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada de micrográficas capturadas con un microscopio fluorescente (Olympus BX61) utilizando el software Image-Pro Premier 9.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) Los datos son presentados como la media de la intensidad de la fluorescencia (unidades arbitrarias) de al menos 8 COCs por tratamiento (de al menos tres experimentos independientes).

2.10 Localización de la conexina 43 por inmunofluorescencia

2.10.1 Principio

El marcaje de proteínas mediante inmunotinción permite localizar una proteína específica dentro del sistema celular. Se utiliza un anticuerpo específico que reconoce la proteína a buscar en el sistema (en este caso, Cx43), después, un segundo anticuerpo acoplado a un fluorocromo se incorpora para reconocer al primer anticuerpo y poder emitir una marca fluorescente en el lugar donde se encuentra la proteína blanco. La observación de la marca se realiza en un microscopio de fluorescencia y/o confocal, eligiendo el filtro y la onda de luz correcta para excitar al fluorocromo y ver la marca fluorescente.

2.10.2 Procedimiento

La proteína Cx43 fue cuantificada por inmunotinción. Los COCs pretratados con el vehículo, BPA o CBX fueron montados en fresco en laminillas gelatinizadas y fijados con etanol al 70% (-20°C/20 min). Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS (uno a 4°C y otro a temperatura ambiente por 5 min). Después de realizarse un bloqueo al incubar los COCs con PBS+BSA (0.2%) a temperatura ambiente por 10 min, los COCs fueron incubados con un anticuerpo primario (policlonal) de conejo anti-Cx43 (Santacruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) durante toda la noche a 4°C en una dilución 1:250. Después de 2 lavados con PBS, los COCs se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con el fluorocromo Alexa-Fluor 594 durante 1 h a temperatura ambiente (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, USA) en una dilución 1:400. 15 min antes del final de la última incubación, el DAPI fue adicionado en una dilución 1:100. Se realizaron 2 lavados y las muestras fueron montadas con Vectashield y un cubreobjetos y almacenadas en refrigeración y oscuridad hasta su evaluación. Se capturaron micrografías de los COCs en un microscopio confocal Leica TCS-SPS-MO (Wetzlar, Alemania) y analizadas en el software Leyca Microsystems LAS AF Lite. La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada en tres COCs diferentes de tres experimentos independientes.

2.11 Expresión de ARN mensajero de las conexinas 37 y 43 en el COC

2.11.1 Principio

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-PCR) amplifica (*in vitro*) un fragmento específico de ADN, tomando como base pequeñas cantidades de un ADN molde en donde el producto se detecta conforme la reacción progresa. Es decir, se cuantifica de forma inmediata el producto amplificado gracias a una marca fluorescente presente en cada una de las amplificaciones.

2.11.2 Procedimiento

Para la obtención del ARN se utilizaron, aproximadamente, 30 COCs por tratamiento usando un mini kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo a los protocolos de fábrica. Las concentraciones de ARN fueron determinadas en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). El ADN complementario (cADN) fue preparado de muestras de ARN usando iScript cDNA Synthesis (BIO-RAD, Hercules CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción qPCR fue realizada de acuerdo con el protocolo de Cárdenas-González y cols., 2013. Brevemente, las muestras de cDNA fueron mezcladas en un rango de 1:5 on Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (K0221; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y después sujetas a cuantificación en un sistema de CR StepOnePlus® en tiempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La proteína β -actina (Actb) fue utilizada para cada muestra como control interno. Las secuencias específicas de los oligonucleótidos para qPCR (5`-3`) fueron las siguientes: Cx43 (NM_010288.3) forward: gatcgcgtgaagggaagaag; Cx43 reverse: cagccattgaagtaagcatatttg; Cx37 (NM_008120.3) forward: gggcgctcatgggtacctat; Cx37 reverse: gctccatggtccagccata; Actb (NM_007393) forward: ctggcaccacaccttctac; Actb reverse: gggcacagtgtgggtgac. La qPCR fue realizada con una incubación inicial de 10 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 seg y una temperatura de alineamiento de 60°C (Cx43), 59°C (Cx37), 55°C (Actb), y una extensión de 20 seg a 72°C. Los datos son presentados como la media de las veces que se realizó el cambio en los niveles de expresión del ARNm.

2.12 Análisis estadístico

Los resultados fueron confirmados en, al menos, 3 experimentos independientes. Las comparaciones entre 3 o más grupos fueron realizadas usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba *post hoc* de Dunnett. Una $p \leq 0.05$ fue considerada como significativa.

Se utilizó el software GraphPad Prism 5 para realizar todos los análisis estadísticos y las figuras.

3. Resultados

3.1 Efecto del Bisfenol A sobre la viabilidad de los ovocitos

Como un indicativo de toxicidad en el COC, la viabilidad de los ovocitos fue evaluada en los tiempos de 2 y 18 h posteriores a la exposición de BPA. Este parámetro se evaluó en ovocitos sin previo estímulo de maduración (indicado como "sin EGF" en las figuras) y con el estímulo (EGF) (indicado como "EGF" en las figuras). Después de la separación de las células de la cúmula, los ovocitos fueron marcados con yoduro de propidio y Hoechst. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad de los ovocitos expuestos a las diferentes concentraciones de BPA o de los controles positivos DES (evaluado a las 2 y 18 h), CBX (evaluado sólo a las 2 h) o DON (evaluado sólo a las 18 h), ni entre los tiempos de exposición (Figura 7). Estos resultados sugieren que las concentraciones de BPA utilizadas en el presente estudio no afectan la viabilidad de los COCs en el modelo experimental.

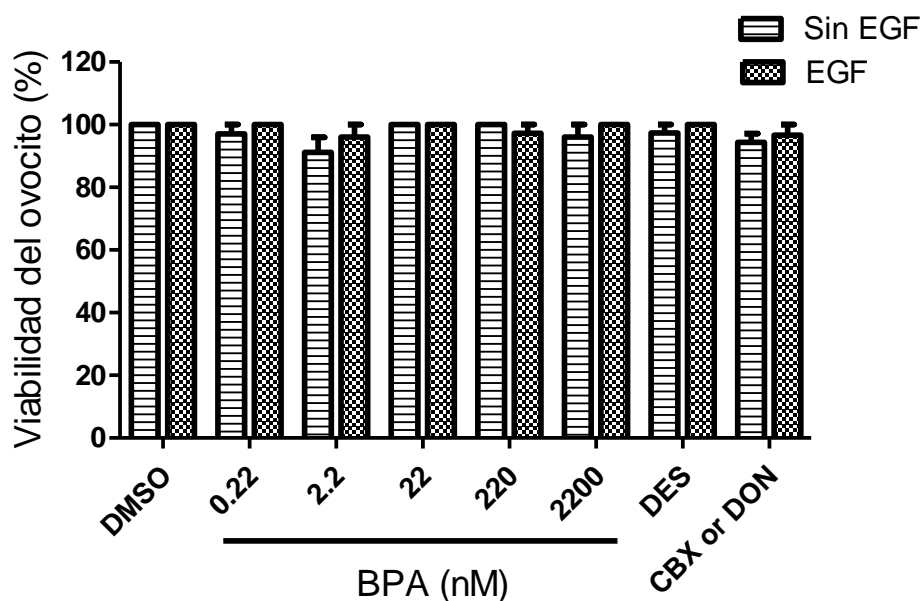


Figura 7. Efecto de la exposición a BPA sobre la viabilidad de los ovocitos. COCs de ratones hembra fueron cultivados durante 2 h con el vehículo (DMSO), BPA (0.22, 2.2, 22, 220 y 2200 nM), DES, CBX o DON. Para promover la maduración del ovocito, los cultivos se incubaron con EGF (25 ng/ml) durante 16 h. Cada barra representa la media \pm EE de 15-57 COCs en 3 experimentos independientes. DMSO: dimetilsulfóxido; DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucina; DES: dietilestilbestrol; CBX: carbenoxolona; EGF: factor de crecimiento epidermal. No se encontraron diferencias significativas con la prueba de Dunett.

3.2 Efecto del BPA sobre presencia de la ruptura de la vesícula germinal

La salida del arresto de la profase I se conoce como reanudación meiótica, se da como resultado del estímulo de la LH sobre el COC y se caracteriza morfológicamente como la ruptura de la vesícula germinal, marcando el comienzo de la maduración del ovocito (Fulka y cols., 1998; Salustri, 2000; Zhuo y Shimata, 2001; Scarchilli y cols., 2007; Norris y cols., 2008; Yokoo y cols., 2010; Shuhaibar y cols., 2015). Con el objetivo de evaluar si la exposición de los COCs a BPA detonaba la ruptura de la vesícula germinal, se realizó la evaluación con COCs expuestos por 2 h a diferentes concentraciones de BPA (sin el estímulo de maduración). Se observó un aumento estadísticamente significativo en los COCs expuestos a BPA 2.2, 22 y 220 nM, en comparación con el grupo control (Figura 8).

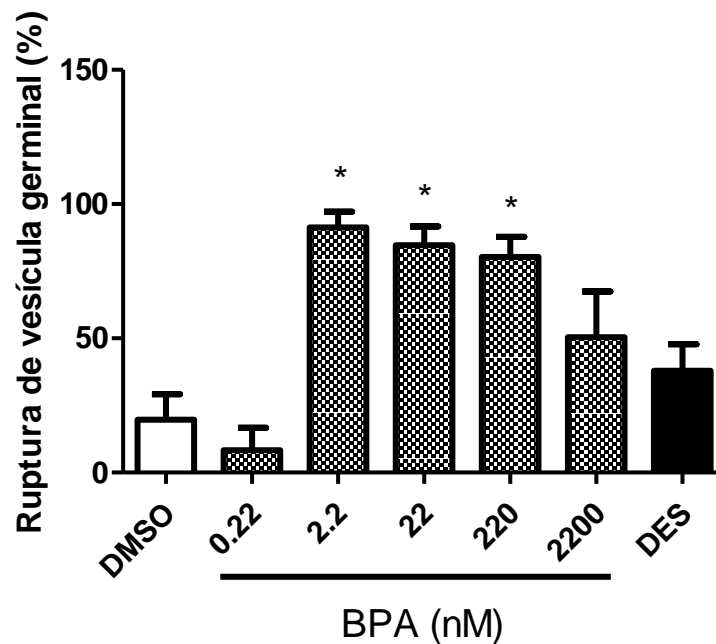


Figura 8. Efecto de la exposición a BPA sobre la ruptura de la vesícula germinal. COCs de ratones hembra fueron cultivados durante 2 h con el vehículo (DMSO), BPA (0.22, 2.2, 22, 220 y 2200 nM), DES, CBX o DON. Después de la exposición, los ovocitos se desnudaron mecánicamente y el material genético se tiñó con iodo de propidio. Cada barra representa la media \pm EE de 15-57 COCs en 3 experimentos independientes. DMSO: dimetilsulfóxido; DES: dietilestilbestrol. * Significancia estadística ($p < 0.05$) con respecto al control al realizar un análisis Dunett.

3.3 Efecto del BPA sobre la progresión de la meiosis (fases de la meiosis desde prometafase I hasta MII)

Inmediatamente después de la reanudación se da la progresión de la meiosis, avanzando por los estadios de prometafase, metafase I, anafase I, telofase I y metafase II (MII). La correcta congregación del material genético, así como la correcta posición de los cromosomas en el huso meiótico de la MII, logran la maduración nuclear del ovocito, la cual es necesaria para que se lleve a cabo una fertilización exitosa del mismo (Fulka y cols., 1998; Scarchilli y cols., 2007; Norris y cols., 2008; Yokoo y cols., 2010). Con el fin de reconocer alguna alteración del material nuclear durante la progresión de la meiosis, los ovocitos expuestos *in vitro* a BPA fueron marcados con yoduro de propidio a las 18 h después de la exposición al compuesto (las cuales incluyen 16 h de estímulo de maduración con EGF) y evaluados en un microscopio de fluorescencia para reconocer los diferentes estadios de maduración (Figura 9). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos que se encontraban en prometafase I (Figura 9A) o metafase I (Figura 9B) entre los distintos tratamientos. Sin embargo, se observó un incremento significativo de ovocitos en anafase I y en telofase I con los tratamientos de BPA a partir de 22 nM (Figuras 9C y 9D) y una disminución en el número de ovocitos en el estadio de MII con el tratamiento de BPA a partir de 2.2 nM (Figura 9E). El control positivo, DES, también presentó un incremento significativo en el porcentaje de ovocitos en anafase I (Figura 9C) y una disminución significativa de los ovocitos en metafase II (Figura 9E).

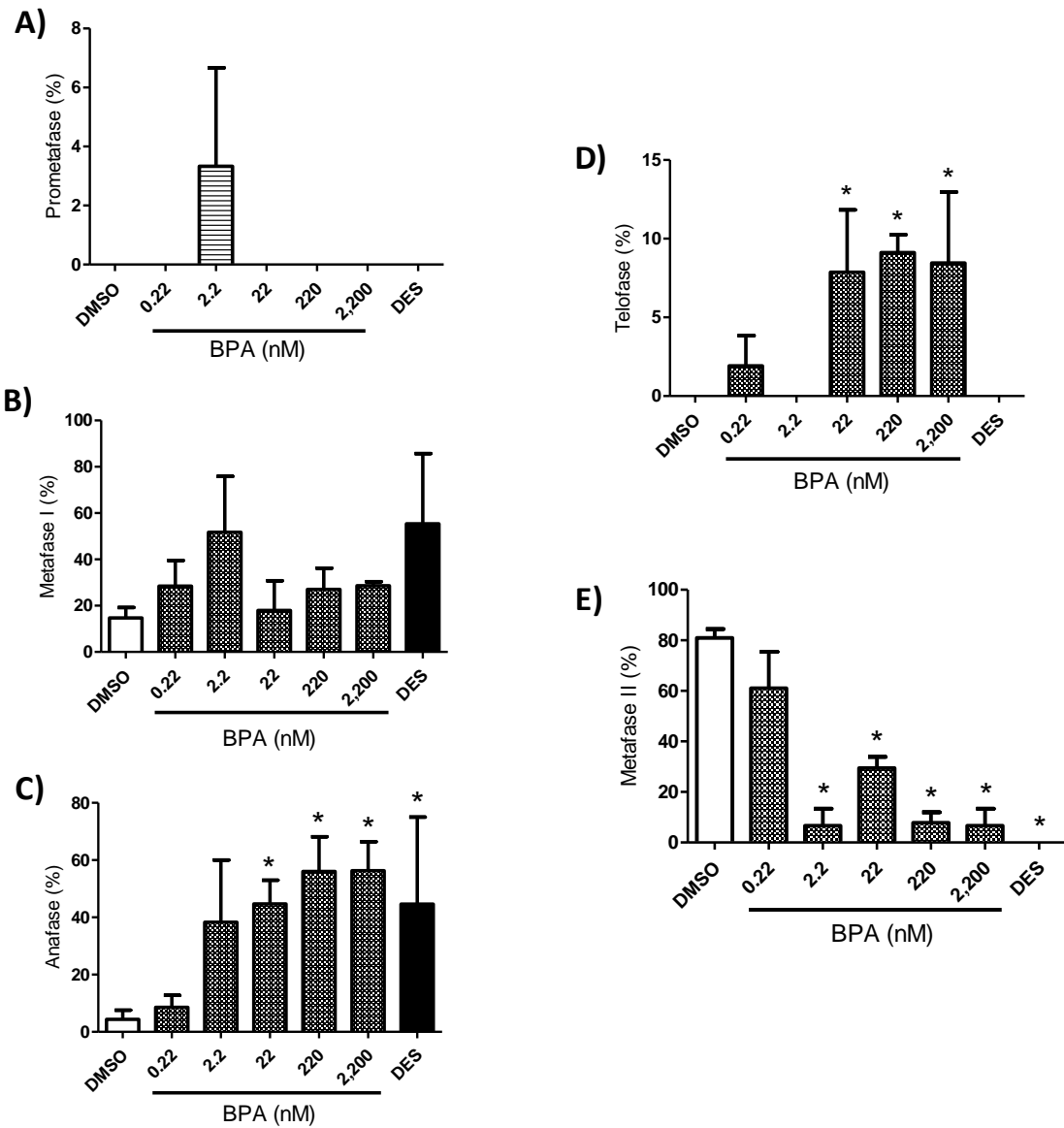


Figura 9. Efecto de la exposición a BPA sobre las fases de la reanudación de la meiosis en el ovocito. COCs de ratones hembra fueron cultivados durante 2 h con el vehículo (DMSO), BPA (0.22, 2.2, 22, 220 y 2200 nM) o DES y después sometidos a un estímulo de maduración con EGF (25 ng/ml) durante 16 h. Posterior a la exposición, los ovocitos se desnudaron mecánicamente y el material genético se tiñó con ioduro de propidio. Cada barra representa la media \pm EE de 15-57 COCs en 3 experimentos independientes. DMSO: dimetilsulfóxido; DES: dietilestilbestrol; EGF: factor de crecimiento epidermal. * Significancia estadística ($p \leq 0.05$) con respecto al control al realizar una prueba de Dunnett.

3.4 Efecto del BPA sobre la formación del primer cuerpo polar durante la maduración del ovocito

Después de retirar las células de la cúmula de los ovocitos tratados por 18 h con BPA y 16 h con EGF y, antes de realizar el marcaje de los ovocitos para evaluar la progresión de la meiosis, se obtuvieron imágenes en un microscopio con contraste de fases para observar la correcta formación y presencia del primer cuerpo polar (como parte de la correcta progresión de la meiosis). En una evaluación cualitativa, se observó que varios de los ovocitos tratados con BPA presentaban una proyección de la membrana citoplasmática sin separarse por completo del ovocito (Figura 10B). Sin embargo, en los ovocitos incubados con el vehículo (DMSO) se observó la formación completa del primer cuerpo polar el cual es protruido del ovocito y permanece en el espacio entre la membrana del ovocito y la zona pelúcida (Figura 10A).

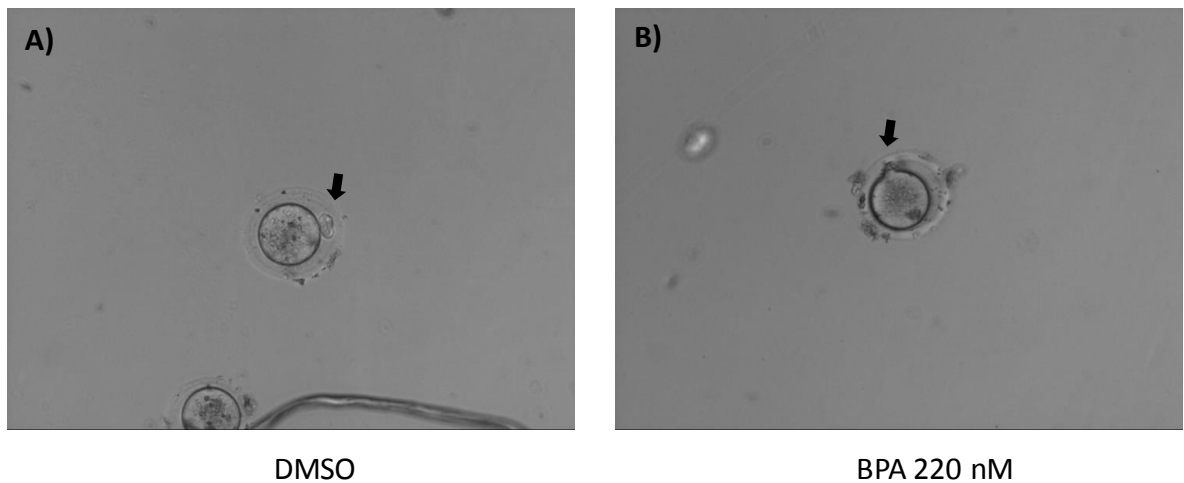


Figura 10. Efecto del BPA sobre la extrusión del primer cuerpo polar. Micrográficas obtenidas después de retirar las células de la cúmula de ovocitos expuestos a BPA por 18 h y a un estímulo de maduración (EGF) de 16 h. En la imagen A se observa la presencia del primer cuerpo polar completamente separado del citoplasma del ovocito. En la figura B se observa una proyección del citoplasma que no se separa totalmente del ovocito. Las flechas indican la formación completa del cuerpo polar en la imagen A y la protrusión incompleta del cuerpo polar en la imagen B. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de contraste de fases.

3.5 Efecto de la exposición a BPA sobre la comunicación del COC mediada por uniones Gap

En nuestro estudio investigamos si la ocurrencia de la reanudación de la meiosis de forma temprana era una consecuencia de un efecto sobre las uniones Gap en los COCs. Para esto, realizamos diferentes ensayos para evaluar la comunicación en las uniones Gap formadas con Cx43 (en las células de la cúmula) y con Cx37 (en el ovocito).

3.5.1 Comunicación hacia el ovocito (Conexina 37)

En el presente estudio se realizó un experimento para evaluar la comunicación de las células de la cúmula hacia el ovocito (Figura 11). En este experimento, los COCs se incubaron con calceína-AM que pasa a través de las uniones Gap de las células de la cúmula y del ovocito (Cx43 en las células de la cúmula y Cx37 en el ovocito (Figura 11A). Se observó una disminución en la intensidad de la fluorescencia de la calceína en los ovocitos de los COCs tratados con 22, 220 y 2200 nM de BPA, así como en los controles positivos DES y CBX, comparados con los ovocitos del grupo control (Figura 11B).

Se evaluaron los niveles de ARNm de la Cx37, la cual es la proteína que forma las conexiones en el ovocito (Figura 11C). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de Cx37 entre los tratamientos.

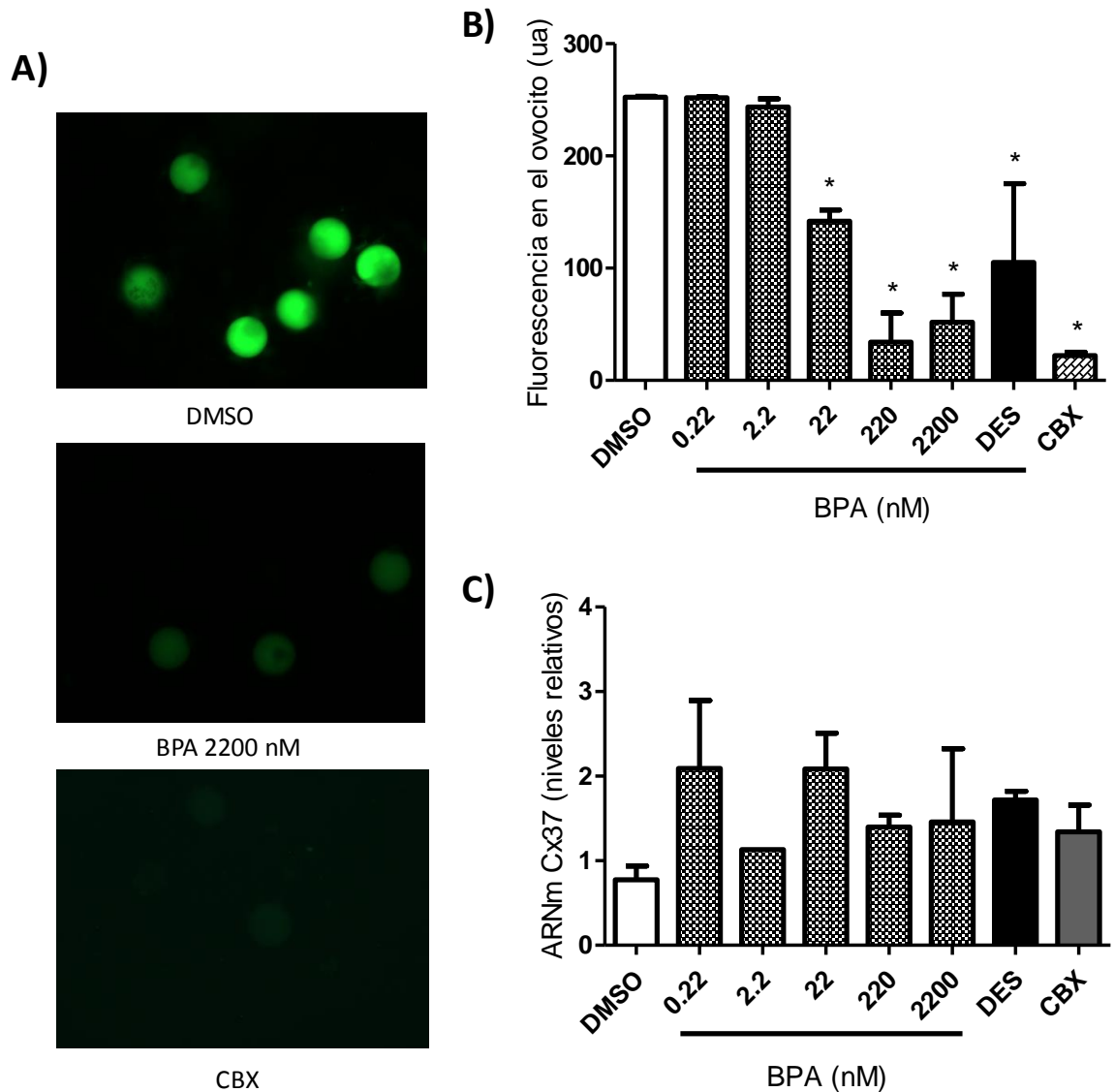


Figura 11. Efecto de la exposición a BPA sobre la comunicación del ovocito mediada por uniones Gap y los niveles de ARNm de la conexina 37 (Cx37). COCs de ratones hembra fueron cultivados durante 2 h con el vehículo (DMSO), BPA (0.22, 2.2, 22, 220 y 2200 nM), DES, CBX o DON. Después los COCs se incubaron con calceína-AM (1 μ M) durante 15 min y posteriormente se incubaron en un medio libre de calceína durante 30 min para permitir la entrada del marcador fluorescente en el ovocito. Los ovocitos se desnudaron mecánicamente y la fluorescencia se cuantificó. Los COCs fueron sometidos a qPCR. Los valores de ARNm fueron normalizados con β -actina. A) Micrografías representativas de los ensayos con DMSO, BPA 2200 nM y CBX; B) Intensidad de la fluorescencia en el ovocito. C) Niveles relativos de ARNm de la conexina 37. Cada barra representa la media \pm EE de 15-57 COCs en 3 experimentos independientes. DMSO: dimetilsulfóxido; DES: dietilestilbestrol; CBX: carbenoxolona. * Significancia estadística ($p \leq 0.05$) con respecto al control al realizar una prueba de Dunnett.

3.5.2 Comunicación entre las células de la cúmula (Conexina 43)

La Cx43 forma los conexones de unión localizados entre las células de la cúmula y aquellos localizados entre células de la cúmula y el ovocito (Norris y cols., 2008). Con el fin de evaluar si estas uniones Gap estaban funcionales se realizó una batería de ensayos incluyendo el ensayo de Gap-FRAP, la presencia de la proteína a través de inmunofluorescencia y los niveles de ARNm de la Cx43 en el COC.

En el ensayo de Gap-FRAP se evaluó la comunicación de las células mediada por uniones Gap, cuantificando la intensidad de la fluorescencia en las células que fueron blanqueadas previamente. Se observó una disminución significativa de la intensidad de la fluorescencia en los COCs tratados con BPA 2.2 y 2200 nM, así como en los controles positivos DES y CBX con respecto al grupo control (Figura 12A).

Los niveles de ARNm de la Cx43 fueron cuantificados en los COCs de los diferentes tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control, lo que coincide con la evaluación de la presencia de la proteína (Figura 12C).

Para evaluar la presencia de la Cx43 en los COCs, éstos fueron marcados mediante la técnica de inmunofluorescencia y la intensidad de la marca se cuantificó en micrografías usando el software Leica Microsystems LAS AF Lite. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de la fluorescencia de los COCs tratados con respecto al control (Figura 12B). También se realizaron experimentos para localizar la Cx43 en las células de la cúmula, a nivel de la membrana o del citoplasma (Figura 13). Se localizó a la Cx43 alrededor de las células de la cúmula en los COCs del grupo control, sin embargo, la proteína no se localizó en los COCs, incubados con BPA (Figura 13).

Estos resultados sugieren que el BPA afectó la función de la Cx43 en las células de la cúmula sin presentar una dosis respuesta hacia el compuesto y sin alterar la presencia de la proteína.

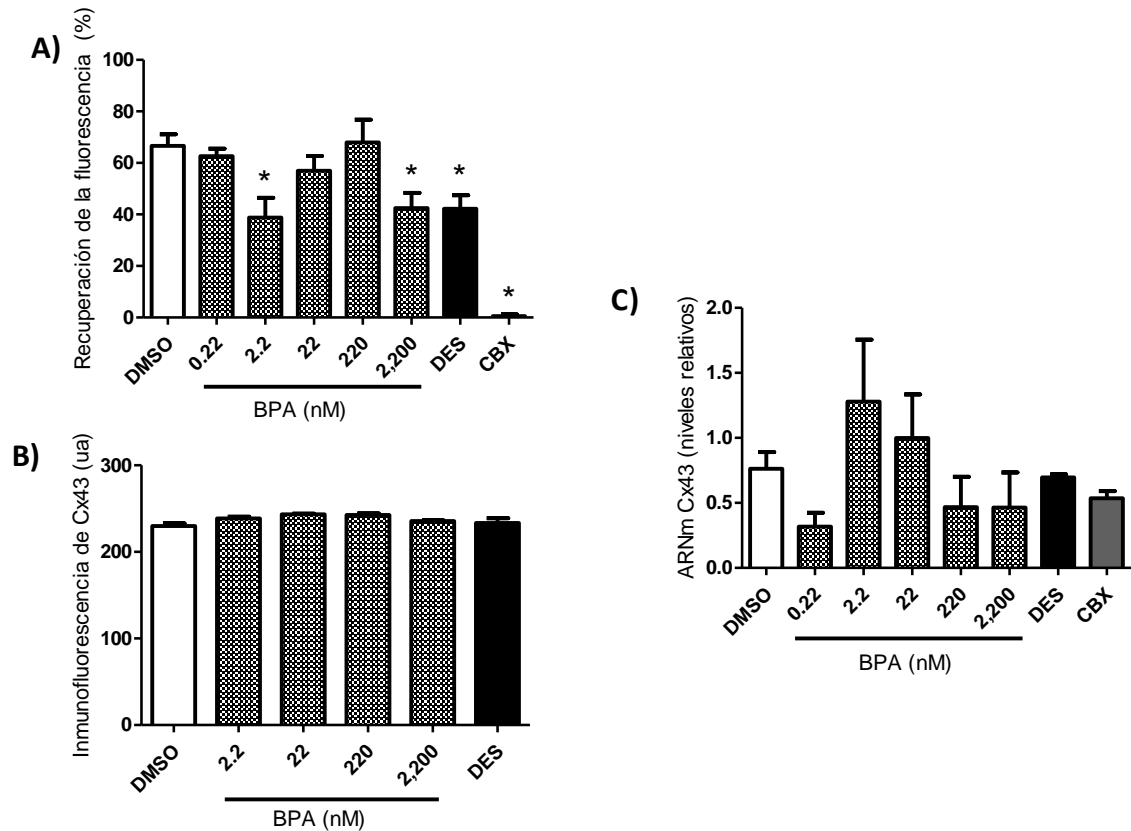


Figura 12. Efecto de la exposición a BPA sobre la comunicación del ovocito mediada por uniones Gap (Cx43). COCs de ratones hembra fueron cultivados durante 2 h con el vehículo (DMSO), BPA (0.22, 2.2, 22, 220 y 2200 nM), DES, CBX o DON. A) Después se incubaron con calceína-AM (1 μ M) por 30 min, se colocaron en un medio libre de calceína-AM y se sometieron al ensayo de Gap-FRAP para evaluar la comunicación entre las células de la cúmula; B) Los COCs se fijaron y se marcaron con un anticuerpo fluorescente dirigido a Cx43; C) Después del cultivo, los COCs fueron sometidos a qPCR. Los valores de ARNm fueron normalizados con β -actina. Cada barra representa la media \pm EE de 15-57 COCs en 3 experimentos independientes. DMSO: dimetilsulfóxido; DES: dietilestilbestrol; CBX: carbenoxolona. * Significancia estadística ($p \leq 0.05$) con respecto al control al realizar el análisis Dunnett.

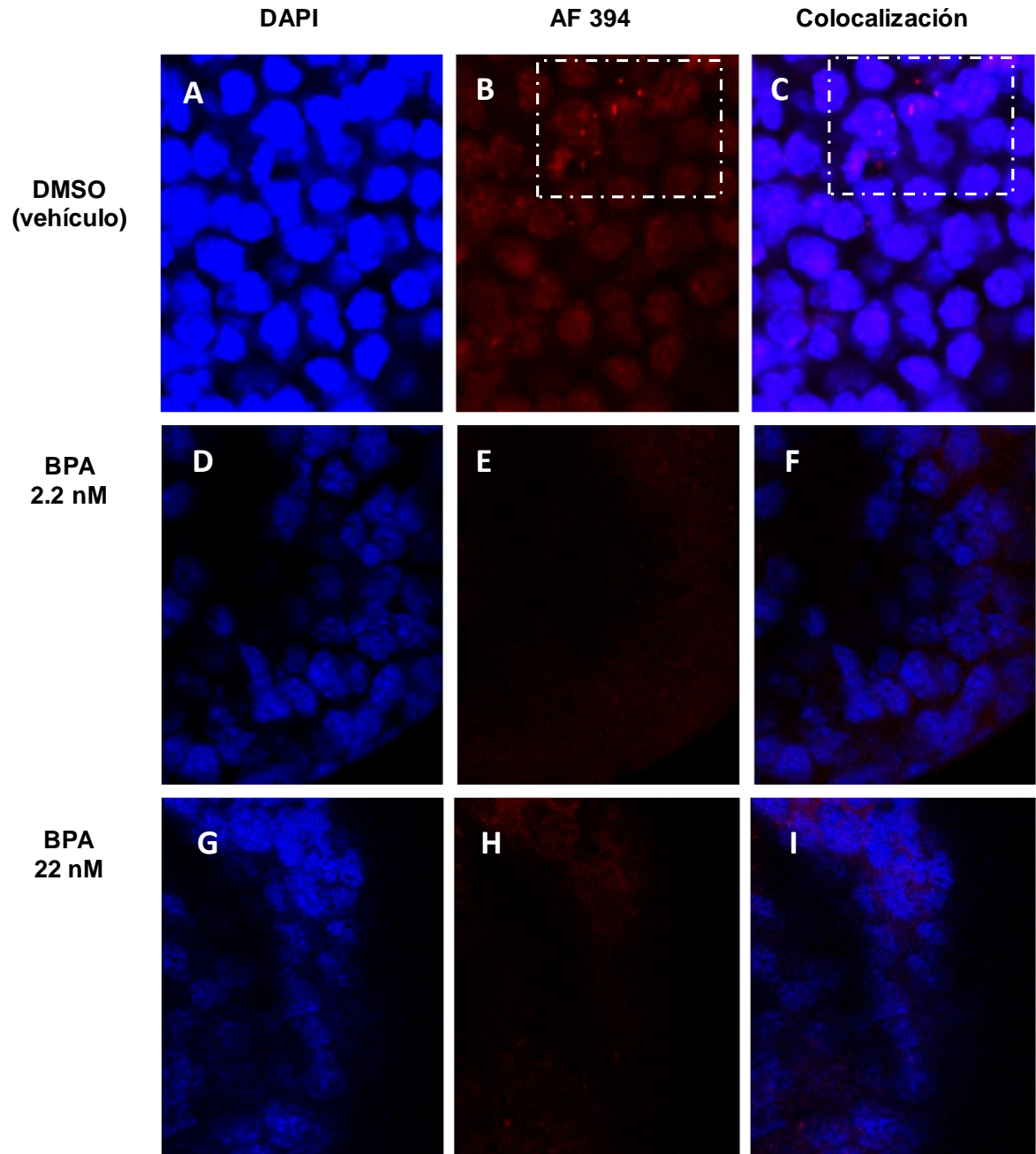


Figura 13. Micrografías representativas de la inmunolocalización de Cx43 en las células de la cúmula de COCs incubados con BPA. Las imágenes fueron capturadas en un microscopio confocal con un objetivo de 100X. La primera columna de imágenes corresponde a la tinción de los núcleos de las células de la cúmula con DAPI, la segunda columna representa la marca de la Cx43 marcada con el fluorocromo Alexa Fluor® 384 y la tercera columna corresponde a la colocalización de ambas imágenes. A, B y C: Imágenes de COCs incubados con DMSO (vehículo); D, E y F: imágenes de COCs tratados con BPA 2.2 nM; G, H y I: imágenes de COCs tratado con BPA 22 nM. Los rectángulos blancos punteados en las imágenes B y C muestran la localización de la Cx43 alrededor de las células de la cúmula.

3.6 Comparación del efecto de la carbenoxolona entre la reanudación y la progresión de la meiosis

Con el objetivo de conocer si el bloqueo de la GJIC promovía cambios en la reanudación y en la progresión de la meiosis, los COCs se incubaron con el control positivo carbenoxolona (CBX) (Figura 14). Al evaluar la ruptura de la vesícula germinal, el grupo tratado con CBX se comportó igual que los COCs tratados con BPA (Figura 14A), ya que se observó un incremento significativo en el porcentaje de ovocitos que presentaron ruptura de la vesícula germinal, comparado con el grupo control (Figura 14A).

Para evaluar los cambios en la progresión de la meiosis a MII, los COCs tratados con CBX fueron incubados con EGF por 16 h y, posteriormente, se evaluó el alineamiento de los cromosomas en los diferentes estadios de la meiosis, de profase I a MII (Figura 14B). Se observó un incremento significativo en el porcentaje de ovocitos que permanecieron en profase I y una disminución en el porcentaje de ovocitos en MII, comparando los porcentajes con el grupo control (Figura 14B).

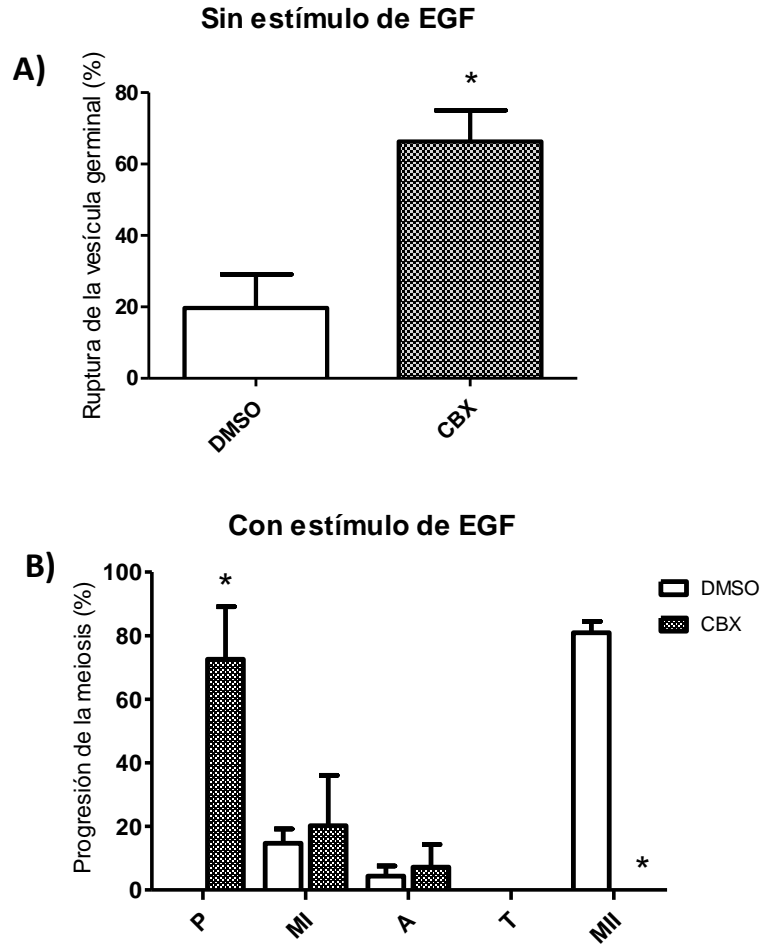


Figura 14. Comparación del efecto de la carbenoxolona entre la reanudación y la progresión de la meiosis. COCs de ratones hembra fueron cultivados durante 2 h con el vehículo (DMSO), BPA (0.22, 2.2, 22, 220 y 2200 nM), DES, CBX o DON y después sometidos a un estímulo de maduración con EGF (25 ng/ml) durante 16 h. Posterior a la exposición, los ovocitos se desnudaron mecánicamente y el material genético se marcó con yoduro de propidio. A) Ovocitos que presentaron ruptura de la vesícula germinal a las 2 h de tratamiento. B) Etapas de la reanudación de la meiosis donde se encontraron los ovocitos tratados por dos h y madurados con EGF. Cada barra representa la media \pm EE de 15-57 COCs en 3 experimentos independientes. EGF: factor de crecimiento epidermal. *Significancia estadística ($p \leq 0.05$) con respecto al control al realizar una prueba de Dunnett.

3.7 Efecto de la exposición a BPA sobre la expansión de las células de la cúmula y su relación con la progresión y la reanudación de la meiosis usando un inhibidor de la expansión

Debido a que la expansión de las células de la cúmula se relaciona directamente con el comienzo de la maduración del ovocito y, por ende, con la reanudación de la meiosis (Zhuo y Kimata, 2001; Yokoo y cols., 2008), se investigó si las concentraciones de BPA usadas en este estudio alteraban este parámetro. Se observó una disminución significativa de la expansión en los COCs tratados con BPA 0.22 y 220 nM. De igual forma se observó una disminución en la expansión en los COCs tratados con el control positivo DON (Figura 15A). Cabe señalar que el DON inhibe la actividad de la enzima hialuronidasa en las células de la cúmula y en consecuencia inhibe la producción de ácido hialurónico (Chen y cols. 1993; Yokoo y cols. 2008).

Con el objetivo de evaluar si el control positivo DON mimetizaba los efectos del BPA sobre la reanudación y progresión de la meiosis, se evaluaron parámetros similares a los evaluados con el BPA. No se observaron diferencias significativas entre los COCs tratados con DON y el grupo control al evaluar en la ruptura de la vesícula germinal (Figura 15B). En la evaluación de la progresión de la meiosis, se observó un incremento significativo en el porcentaje de ovocitos en profase I y metafase I, así como una disminución en el porcentaje de ovocitos que llegaron a MII, comparada con el grupo control (Figura 15C).

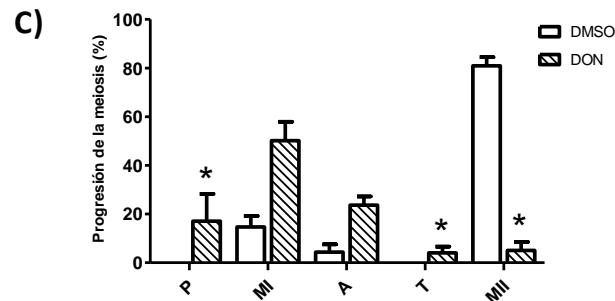
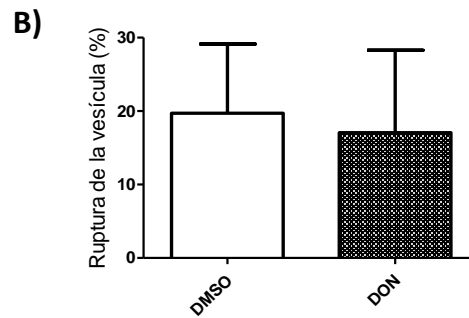
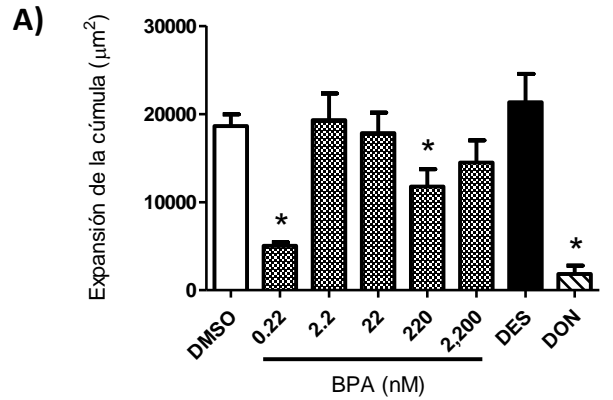


Figura 15. Efecto de la exposición a BPA sobre la expansión de las células de la cúmula y su relación con la progresión y reanudación de la meiosis usando un inhibidor de la expansión. COCs de ratones hembra fueron cultivados durante 2 h con el vehículo (DMSO), BPA (0.22, 2.2, 22, 220 y 2200 nM), DES, CBX o DON y después sometidos a un estímulo de maduración EGF (25 ng/ml) durante 16 h. A) Antes y después de la maduración, se obtuvieron imágenes de los COCs en el microscopio estereoscópico para medir el área y realizar una diferencia de los valores. B) y C) Después de la exposición, los ovocitos se desnudaron mecánicamente y el material genético se marcó con ioduro de propidio. Cada barra representa la media \pm EE de 15-57 COCs en 3 experimentos independientes. DMSO: dimetilsulfóxido; DES: dietilestilbestrol; DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucina; EGF: factor de crecimiento epidérmico. * Significancia estadística ($p \leq 0.05$) con respecto al control al realizar una prueba de Dunnett.

4. Discusión

Dado que el BPA afecta tanto a la GJIC (Lee and Rhee 2007; Li y cols., 2009; Campen y cols., 2017) como a la transición de PI a MII (Can y cols., 2005; Lenie y cols., 2008; Wang y cols., 2016) y, debido a que la interrupción en la GJIC da como resultado la transición de GV a la GVBD (Wang y cols., 2016; Tiwari y Chaube 2012), la pregunta fundamental que tuvo este trabajo fue si el BPA alteraba el proceso de meiosis en los ovocitos al afectar la GJIC en el COC de forma atemporal.

4.1. Obtención de COCs a partir de folículos preovulatorios estimulados con hormona gonadotrofina coriónica equina (eCG)

En nuestro estudio, los COCs utilizados en los cultivos se obtuvieron de ratones hembra previamente estimuladas con la hormona eCG. Esta gonadotropina forma parte del protocolo de superovulación cuya función es simular el efecto de la FSH y reclutar la mayor cantidad de folículos antrales para desarrollarlos a folículos preovulatorios, con la habilidad de liberar al ovocito (Lane y Garner, 2004). Los folículos preovulatorios son más sensibles al estímulo de la LH, hormona que promueve la maduración del ovocito desencadenando diferentes procesos en el COC que preparan al ovocito para ser liberado del folículo y fertilizado por un espermatozoide (Conti y cols., 2012; Hernández-Ochoa y cols., 2018). Sabiendo que los COCs obtenidos de folículos preovulatorios son los más apropiados para realizar las evaluaciones durante el proceso de maduración del ovocito (Junk y cols., 2003), este estudio se realizó con COCs de ratón obtenidos después del estímulo de eCG. Este cultivo primario difiere de los COCs obtenidos en el estudio de Campen y cols. (2016), donde los cultivos primarios se realizaron a partir de COCs obtenidos de folículos antrales de rata sin tratamiento hormonal exógeno. Las evaluaciones realizadas en nuestro estudio requerían de COCs competentes para realizar la reanudación y progresión de la meiosis, así como detonar la

expansión de las células de la cúmula, procesos involucrados en la maduración del ovocito (Junk y cols., 2003; Yokoo y Sato, 2004).

4.2. Maduración de COCs murinos en cultivo primario estimulado con el factor de crecimiento epidermal (EGF)

En nuestro estudio utilizamos al EGF como estímulo detonador de la maduración, ya que mimetiza a la vía de señalización que la LH desencadena desde las células de la cúmula hasta el ovocito (Richani y Gilchrist, 2018).

Para evaluar la maduración del ovocito en un sistema *in vitro* es necesario el uso de estímulos que asemejen los efectos de la LH en un sistema *in vivo* (Junk y cols., 2003), además de preservar constantes la temperatura, el pH, el tiempo de maduración, los nutrientes del medio, etc. Diferentes moléculas como hormonas (e.j. FSH, eCG), factores de crecimiento (e.j. EGF), fluido folicular y moléculas sintéticas, que incluyen a la forskolina y al éster de forbol miristato (PMA, por sus siglas en inglés: *phorbol myristate acetate*), entre otras, han sido utilizadas en sistemas como promotores de la maduración *in vitro* del ovocito para detonar la reanudación y progresión de la meiosis, así como la expansión de las células de la cúmula, lo cual producirá un ovocito con calidad fértil (Junk y cols., 2003; Conti y cols., 2012).

La hormona FSH promueve la maduración del ovocito, mimetizando la acción de la LH de forma natural. La FSH se une a receptores presentes en las células de la cúmula (el ovocito carece de estos) (Eppig y Downs, 1987), activando a la enzima adenilato ciclasa, lo que aumenta la producción de AMPc y mantiene activa a PKA. También activa a ERK en las células de la cúmula induciendo cambios periovulatorios que detonan la reanudación de la meiosis y la expansión de las células de la cúmula (Russell y Robker, 2007).

El EGF es una proteína que también se utiliza como promotor de la maduración de los ovocitos en sistemas *in vitro*. Este factor de crecimiento forma parte de la cascada de señalización que detona el estímulo de la LH para reanudar la

meiosis y llevar a cabo los demás procesos en el COC durante la maduración (Richani y Gilchrist., 2018).

De forma natural, el estímulo de la LH induce la producción de péptidos "EGF-like" tales como anfiregulina, epirregulina, betacelulina y neuroregulina 1 en las células de la granulosa y la cúmula. Las tres primeras activan al receptor de EGF (EGFR) que induce una señal río abajo para regular a la cinasa 1 y también la vía de señalización de ERK 1/2 en las células de la cúmula. La actividad de EGFR-ERK 1/2 es crucial para que se lleve a cabo la ovulación y la competencia fértil del ovocito. Se ha reportado que el uso de EGF ha dado mejores respuestas que la FSH durante el proceso de maduración *in vitro* (Richani y Gilchrist., 2018).

La forskolina, un activador de la enzima adenilato ciclasa, promueve, en primera instancia, que aumenten los niveles de AMPc en el ovocito por corto tiempo, para después reanudar la meiosis (Lu y cols., 2001). El PMA, un activador de la PKC ha producido diferentes respuestas en los ovocitos, ya que se han reportado efectos de inhibición de la meiosis en algunos modelos mientras que en otros se ha observado que promueve la progresión de la meiosis (Lu y cols., 2001). El PMA en ovocitos bovinos promueve la maduración del ovocito mientras que, en ratones se ha observado un efecto contrario (Lu y cols., 2001). Descartamos el uso del PMA con forskolina porque se ha reportado que éste se comporta de manera contraria en los COCs de diferentes especies, por ejemplo, en COCs bovinos y porcinos promueve la maduración del ovocito, mientras que en COCs murinos la inhibe (Lu y cols., 2001; Mondadori y cols., 2008). El uso de la forskolina fue descartado porque produce un aumento en la concentración de AMPc en el COC, evento que podía alterar los parámetros evaluados en el presente estudio (Lu y cols., 2001).

Por lo anterior, el uso del EGF como estimulante de la maduración en un cultivo primario de COCs murinos fue exitoso ya que nos permitió realizar de forma

exitosa la serie de experimentos necesarios para cumplir con los objetivos particulares.

4.3. Relevancia de las concentraciones de BPA y su posible mecanismo de acción a nivel molecular

Uno de los primeros parámetros a evaluar en este estudio fue la viabilidad de los ovocitos después de ser expuestos durante 2 o 18 h a las diferentes concentraciones de BPA, consideradas ambientalmente relevantes. En nuestro estudio se utilizaron concentraciones que van de 0.22 a 2200 nM (equivalentes a 0.05-500 µg/kg). Estas concentraciones abarcan las dosis de ingesta diaria tolerable que reportó la EPA en 2008 (50 µg/kg/d) y la reportada por la Unión Europea en 2016 (EFSA- 4 µg/kg/d). Ninguna de las dosis de BPA utilizadas en este estudio provocó una muerte celular significativa de los ovocitos, antes o después del estímulo con EGF, lo que sugiere que el compuesto evaluado no tiene un efecto citotóxico sobre los COCs, durante el tiempo de cultivo y que el estímulo de maduración no potencia el efecto del BPA. Es importante comentar que no existen estudios comparativos en la literatura en relación con la citotoxicidad del BPA en el COC.

El BPA es un disruptor endócrino que se une “débilmente” al ER con una afinidad de 1000 a 2000 veces más baja que el estradiol; este pronunciamiento sólo se basa en los efectos nucleares que tiene el BPA (coactivador o correpresor transcripcional). Además del efecto nuclear, el BPA también produce efectos extranucleares que pueden inducir una rápida respuesta dependiendo de la localización de los ER. Aunado a lo anterior, los efectos del BPA también dependen del subtipo de ER (ER1 y ER2) al que se unió el compuesto, es decir, la unión del BPA al ER1 ejerce un comportamiento agonista, mientras que su unión al ER2 ejerce un efecto antagonista, lo cual se explica por el cambio de forma de acuerdo al subtipo de ER al que se une el BPA. Actualmente se sabe que el ER1 media la regulación de las vías de la MAPK, involucradas en la fosforilación de las conexinas en las células de la

cúmula (Cx43), las cuales promueven el cierre de la GJIC (Tripathi y cols., 2006; Acconcia y cols., 2015); además, también influencia el proceso meiótico en el ovocito ya que, la activación de MAPK es necesaria para la organización del huso meiótico durante la maduración nuclear.

4.4. Efecto del BPA sobre la reanudación (GVBD) y la progresión de la meiosis (de profase I a MII) del ovocito.

En el presente estudio observamos que el BPA aumenta el número de ovocitos que reanudan la meiosis, sin haber recibido el estímulo de maduración con el EGF. Por ejemplo, hemos observado que los ovocitos de COCs tratados con concentraciones de BPA superiores a 2.2 nM y sometidos a un estímulo de maduración con EGF por 16 h detuvieron el proceso de meiosis en las etapas de anafase y telofase, lo cual provocó que no llegaran a la MII. El efecto perjudicial del BPA de interrumpir la progresión meiótica de los ovocitos, la cual implica alteraciones en la segregación cromosómica, el centrosoma y la dinámica de los microtúbulos, ha sido descrita ampliamente en varias especies, incluidos los seres humanos, ratones y cerdos (Hunt y cols., 2003; Can y cols., 2005; Susiarjo y cols., 2007; Lenie y cols., 2008; Mlynarcíková y cols., 2009; Wang y cols., 2016). En este estudio no se observó un efecto sobre la dinámica del citoesqueleto, sin embargo, se pudo observar la segregación de los cromosomas y la forma anormal en que se congregaban después de las 16 h post-EGF, tiempo suficiente para que la meiosis se encontrara en el estadio de MII, Esto sugiere que también existe una alteración en la dinámica de los microtúbulos y de otras proteínas del citoesqueleto del ovocito (Can y cols., 2005). También se ha observado un efecto del BPA sobre el proceso de mitosis en células somáticas, como en el estudio de Ochi y cols. (1999), quienes observaron la formación de husos mitóticos aberrantes en una línea de células pulmonares de hámster (V79) expuestas a BPA (200 μ M); los efectos observados fueron dependientes de la concentración y se encontraron asociados a la presencia de aneuploidías. La presencia de aneuploidías en el

ovocito por exposición a BPA ha causado controversia, por ejemplo, Hunt y cols. (2003) sugieren la presencia de aneuploidías en los ovocitos de ratonas expuestas a 20, 40 y 100 ng/g de peso corporal de BPA mientras que, Eichenlaub-Ritter y cols. (2008) observaron un arresto meiótico al exponer ovocitos murinos a BPA durante el proceso de maduración *in vitro*, pero sin observar aneuploidías. En nuestro estudio corroboramos el efecto sobre la meiosis, un arresto del proceso meiótico en los estadios de anafase y telofase que impiden la correcta progresión a MII, sin embargo, no realizamos una evaluación de la presencia de aneuploidías en los ovocitos de los COCs expuestos a BPA.

También se ha observado que el BPA afecta de manera significativa la liberación del primer cuerpo polar en COCs porcinos expuesto en un sistema *in vitro* (250 μ M) (Wang y cols., 2016), apoyando el efecto adverso sobre la maduración del ovocito. En el presente estudio observamos el mismo fenómeno ya que los ovocitos presentaron protrusiones similares a un cuerpo polar, sin encontrar la liberación o separación del citoplasma del ovocito. Cabe señalar que la pérdida del material genético presente en el primer cuerpo polar es necesaria para que se logre el número de cromosomas correcto en cada uno de los ovocitos, y se logre un adecuado desarrollo del cigoto (Moore-Ambriz y cols., 2015). Este daño al ovocito puede repercutir directamente en la habilidad de éste para ser fertilizado (Moore-Ambriz y cols., 2015) y en la posibilidad de que el cigoto se desarrolle e implante en el útero (Berger y cols., 2007).

En las hembras de los mamíferos, la división meiótica del ovocito se mantiene en la etapa de diploteno del estadio de profase I desde la etapa neonatal hasta el momento de la ovulación; en las mujeres este proceso dura años, mientras que en los ratones dura meses. La meiosis en el ovocito se mantiene arrestada por los altos niveles de los segundos mensajeros adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y guanósín monofosfato cíclico (GMPc) que son transferidos de las células de la cúmula hacia el ovocito a través de las uniones Gap. De manera fisiológica, el estímulo de la FSH desencadena una serie de eventos mediada

por el EGF, promoviendo el cierre de las uniones Gap en el COC, disminuyendo la concentración de GMPc en el ovocito y activando a la fosfodiesterasa 3A (PDE3A) que hidroliza al AMPc. La caída drástica en los niveles de AMPc en el ovocito desencadena una disminución de la proteína cinasa A (PKA) y una activación de la fosfatasa Cdc25b y de la cinasa Wee1/Myt1, dando como resultado la desfosforilación de CDK1. Esto facilita que CDK1 y ciclina B se unan para formar el factor promotor de la meiosis (MPF; por sus siglas en inglés: *maturation promoting factor*), permitiendo que el ovocito salga del arresto meiótico en el que se encuentra (en profase I) y avance a la MII (Sela-Abramovich y cols., 2006; Norris y cols., 2008; Vaccari y cols., 2009; Tripathi y cols., 2010; Winterhager y Kidder 2015).

Con base en la información previa, podemos concluir que la exposición a BPA detona la cascada de señalización que promueve la reanudación de la meiosis antes de recibir un estímulo de maduración. Este evento se suma a los efectos del BPA sobre el citoesqueleto del ovocito que resultan en una progresión anómala de la meiosis, disminuyendo el porcentaje de ovocitos que progresan a la MII lo cual se refleja en un número disminuido con la presencia del primer cuerpo polar.

4.5. Efecto del BPA sobre la comunicación mediada por uniones Gap en el COC y su relación con la progresión de la meiosis.

Las evaluaciones realizadas a la GJIC mostraron una disminución significativa en los COCs tratados con BPA 2.2 y 2200 nM, sin afectar los niveles de ARNm o la presencia de la proteína Cx43 en el COC. De manera contraria a nuestros resultados, se reportó recientemente un incremento en la GJIC en COCs de rata tratados con BPA, pero sin alterar el tiempo de la reanudación de la meiosis (Campen y cols., 2017). Esto puede deberse a que la etapa de desarrollo folicular fue diferente en ambos estudios. La estimulación hormonal en hembras con una hormona de propiedades similares a la FSH (es decir, eCG), cuyo protocolo fue utilizado en este estudio, promueve el desarrollo del

folículo y mejora la maduración de los ovocitos preparando al COCs con factores similares al EGF y receptores que responden en el momento en que aumenta la LH (CD44, PTX3, TSG6, ácido hialurónico, COX2, etc.) (Farin *et al.* 2007; Yamashita and Shimada 2012).

Se ha demostrado que el BPA altera la GJIC en varios sistemas (Lee y Rhee 2007; Salian y cols., 2009; Oh 2015; Campen y cols., 2017). En testículos de ratas en desarrollo y en edad adulta expuestas en etapa neonatal a BPA (DPN 1-5, 25 µg/cachorro/d) se observó una deslocalización de la proteína Cx43 en las uniones Gap de las células de Sertoli (Salian y cols., 2009). Estudios *in vitro* utilizando la línea celular BICRM1Rk, derivada de epitelio mamario de rata han demostrado que, concentraciones de BPA de 0.8 a 3.2 µM inhiben las GJIC en al menos el 70% del cultivo, de manera irreversible sin que los niveles de proteína, ARNm o fosforilación de la Cx43 se vean alterados (Lee y Rhee 2007). Estos efectos pueden relacionarse con la capacidad del BPA de promover vías no genómicas (extranucleares) mediadas por el ER1 que involucran la activación de la MAPK para bloquear la GJIC en el COC al fosforilar a la Cx43 (Tripathi y cols., 2010; Acconcia y cols., 2015). Aunado a esta evidencia, estudios *in vitro* donde se utilizaron ovocitos de *Xenopus* han demostrado que una concentración de 10 nM de BPA redujo de manera reversible los hemicanales de conexina 46 (Cx46), lo que sugiere que el BPA puede estar bloqueando el paso a través de la unión Gap (Oh, 2015).

Es sabido que algunos compuestos estrogénicos como el 17β-estradiol y la genisteína ejercen su efecto alterando la actividad de la proteína PKC (Iwase y cols., 2006). En el caso particular del estudio de Iwase y cols. (2006) se observó la vía de PKC como una de las vías responsables de bloquear la GJIC en un cultivo de células de Leydig TM3 expuestas a genisteína (25 µM) y a 17β-estradiol (10 pM y 20 µM), ya que al co-incubar con Calfostina C, un inhibidor de esta enzima, se observó una reversión parcial del bloqueo de la GJIC. La PKC también juegan un papel muy importante en la regulación y progresión del ciclo celular y cumple una función importante en la formación

del centrosoma y el ensamble de los microtúbulos (Can y cols., 2005), lo cual puede causar un arresto en la progresión de la meiosis como lo hemos observado en nuestro estudio. Por lo tanto, podemos sugerir que el BPA está afectando la GJIC en el COC a través de una alteración en la actividad de la proteína PKC.

No existen reportes previos donde se relacione el efecto del BPA sobre el cierre de las uniones Gap y el efecto de esta falta de tráfico de moléculas con la reanudación de la meiosis. Con la finalidad de relacionar el cierre de las Gap con la meiosis, se realizó un experimento donde se utilizó CBX para bloquear la GJIC y en el cual se produjeron efectos similares en la reanudación de la meiosis a los observados en los COCs tratados con BPA. Estos resultados concuerdan con aquellos publicados recientemente por un grupo de investigación, quienes observaron también que la CBX promueve la reanudación del ovocito (Tiwari y Chaube, 2017).

4.6. Efecto del BPA sobre la expansión de las células de la cúmula.

Varios estudios han demostrado que el proceso de expansión de las células de la cúmula inicia mediante la activación que da la LH río abajo y que promueve la progresión de la meiosis a MII (Zhuo and Kimata, 2001; Yokoo y cols., 2008; Mlynarcíková y cols., 2009). En concordancia con estudios previos (Mlynarcíková y cols., 2009, Wang y cols., 2016) en nuestro estudio encontramos que el BPA impide la expansión de las células de la cúmula. En específico, un estudio en un cultivo de COCs porcinos evaluó el efecto del BPA sobre la producción del ácido hialurónico presente en la matriz extracelular que se produce durante la expansión de las células de la cúmula y encontraron niveles similares de glucosaminoglicanos, sin embargo, encontraron una diferencia en el patrón de distribución de esta biomolécula estructural en los COCs expuestos a BPA, sugiriendo que el BPA altera el ensamblaje de las proteínas que conforman la matriz extracelular. Después de que el pico de LH estimula la maduración, a la mitad del proceso comienza la producción de

ácido hialurónico por parte de las células de la cúmula. Este glucosaminoglicano se une al receptor de superficie celular CD44 funcionando como un sitio de anclaje para otras proteínas que proporcionan elasticidad a la matriz extracelular, facilitando la expansión de las CC (Zhuo y Kimata 2001; Yokoo y cols., 2008; Yokoo y cols., 2010). Por lo anterior, es probable que el efecto del BPA sobre la expansión de las células de la cúmula se deba a un efecto sobre la unión del CD44 con su sustrato o con la formación de la matriz extracelular. Un estudio realizado en nuestro laboratorio evaluó la expresión de genes involucrados en la expansión como CD-44, TSG6, Has2 y Vcan (Ramírez-Trejo, 2017). Aunque no se observó diferencia en la expresión de los genes mencionados, no se puede descartar un efecto sobre las proteínas en cuestión, ya que no se evaluó la presencia y funcionalidad de la matriz extracelular. También en un estudio realizado por Mansur y cols. (2017) se observó una disminución en la expresión de Has2 (enzima productora del ácido hialurónico que forma la matriz extracelular) en un cultivo de células primario de células de la cúmula de ser humano expuestas a 20µg/L de BPA. Por lo tanto, el efecto del BPA sobre la expansión de las células de la cúmula está directamente ligado a la formación de la matriz extracelular y a la funcionalidad de las proteínas que la componen, sin ligarse con los efectos sobre la reanudación y progresión de la meiosis.

En nuestro estudio observamos que el DON inhibió el proceso de expansión de las células de la cúmula y que el ovocito no alcanzó la MII, incluso después de incubar a los COCs durante 16 h con el estímulo de maduración (EGF). Fisiológicamente, las células de la cúmula responden al estímulo de maduración mediante la secreción de ácido hialurónico y la externalización del receptor CD44, los cuales interactúan para desencadenar la expansión de las células de la cúmula (Salustri, 2000). Sin que se haya puntualizado un mecanismo, Yokoo y cols. (2010) sugirieron que la interacción ácido hialurónico-CD44 desencadena eventos que llevan a la interrupción de la comunicación formada por conexiones de Cx43 (localizados en las CC) y por lo tanto, a la ocurrencia de la reanudación meiótica del ovocito. Sin embargo,

en nuestro estudio, el tratamiento de los COCs con DON no modificó la ocurrencia de la reanudación de la meiosis, pero sí detuvo la progresión de los ovocitos desde prometafase I hacia fases posteriores de maduración. Debido a que el DON inhibe la síntesis de ácido hialurónico (Chen y cols., 1993; Yokoo y cols., 2008), nuestros resultados respaldan a aquellos estudios que sugieren un vínculo entre la expansión del COC y la progresión de la meiosis. Nuestros resultados también respaldan la hipótesis de que el BPA afecta el momento en que ocurre la reanudación y la progresión de la meiosis mediante la alteración de la actividad de la GJIC. Finalmente, nuestros resultados sugieren que la transferencia entre la GJIC en las células de la cúmula, pero no la interacción del ácido hialurónico-CD44, está involucrada en la toxicidad del BPA, ya que estudios previos no han mostrado diferencias en los niveles de ácido hialurónico en COCs tratados con BPA (Mlynarcíková y cols., 2009).

4. 7 Respuesta no monotónica del BPA

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han descrito que el BPA produce un patrón dosis respuesta no monotónico (NMDR, por sus siglas en inglés: *non monotonic dose response*). Este tipo de respuesta se presenta de forma regular al evaluar hormonas y disruptores endócrinos, y ya es reconocida por distintos organismos en E.U., tales como la Sociedad de Endocrinología, los Institutos Nacionales de Ciencias Ambientales (NIEHS, por sus siglas en inglés: *National Institutes of Environmental Health Sciences*) y el Programa Nacional de Toxicología (NTP, por sus siglas en inglés: *National Toxicology Program*) (Gore y cols., 2015; Vandenberg, 2015).

El BPA es clasificado como un disruptor endócrino que ha sido extensamente evaluado en los últimos años debido a su amplio uso y exposición al compuesto. Algunos de esos estudios han reportado una relación no monotónica entre las dosis de BPA y algunos parámetros como el incremento de peso, resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia (Alonso-Magdalena y cols., 2010; Wei y cols., 2011; Angle y cols., 2013). Para citar otros ejemplos de estudios que han descrito una respuesta no lineal del

BPA, Alonso-Magdalena y cols. (2008) realizaron un estudio en ratones macho adultos, y observaron que la exposición a una dosis baja de BPA (100 µg/kg/d) reguló el contenido de insulina pancreática, pero ese efecto no fue significativo con una dosis alta (1 mg/kg/d). En estudios reproductivos, un estudio transgeneracional también describió que la exposición intrauterina a BPA (exposición materna de 0.5, 20 y 50 µg/kg/d) induce una respuesta no monotónica sobre la edad a la que se presenta la apertura vaginal (marcador de la pubertad). Específicamente, se observó un retraso estadísticamente significativo en la edad a la cual la generación F3 presentó apertura vaginal con las dosis baja y alta, pero no con la dosis intermedia (Ziv-Gal y cols., 2015). En estudios epidemiológicos, Erlich y cols. (2013) observaron una asociación entre la concentración urinaria de BPA y la expresión del gen CYP19 (gen que expresa a la enzima aromatasa, productora de estrógenos), de manera no monotónica, en mujeres sometidas a tratamiento de fertilización *in vitro*. Por otro lado, un estudio realizado con BPA a dosis bajas en un rango nanomolar de 0.01-0.1 presentó una NMDR al potenciar la amplificación del centrosoma en líneas de epitelio celular de próstata humana transformadas y no transformadas, la NMDR se observó en 4 de 6 líneas celulares evaluadas (Tarapore y cols., 2014). Cabe señalar que las respuestas no monotónicas se observan también con otros disruptores endócrinos como los contaminantes persistentes orgánicos (trans-nonaclor, diclorodifenildicloroetano –DDE-, bifenilos policlorados -PCB´s- y compuestos químicos parecidos a las dioxinas), el mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), entre otros (Gore y cols., 2015).

Vandenberg (2015) realizó un estudio para evaluar la incidencia de una NMDR en estudios *in vitro* y observó que 59 de 250 experimentos realizados en 93 estudios reportaban una NMDR. Esos estudios tenían la característica de incluir al menos 5 dosis distintas. Además, las dosis abarcaban rangos logarítmicos (5.6 log contra 3.9 log). Cabe señalar que nuestro estudio abarcó la evaluación de 5 dosis logarítmicas de BPA (0.22, 2.2, 22, 220 y 2200 nM) donde observamos NMDR, en al menos un punto de 6 de los experimentos

realizados. Nuestros resultados son apoyados con los controles positivos que utilizamos en cada uno de los experimentos, el DES para las respuestas estrogénicas, el DON para la expansión de las células de la cúmula y la CBX para los experimentos donde se evaluó el cierre de las uniones Gap.

El BPA es un disruptor endócrino con la capacidad de detonar varios mecanismos de acción, incluyendo la interferencia de la actividad de receptores nucleares, principalmente los receptores a hormonas esteroides, y el efecto sobre receptores huérfanos tales como el receptor a aril hidrocarburo (AhR) (De Coster y cols., 2012). Además, el BPA se ha relacionado con vías enzimáticas relacionadas con la síntesis de esteroides y con otros mecanismos relacionados con procesos reproductivos y endócrinos (Marino y cols., 2012). La aparición de varios de los efectos nucleares y extranucleares del BPA están presentes en los estudios que presentan una NMDR, lo que sugiere el amplio rango de efectos del BPA sobre diferentes células blanco (Accocia y cols., 2017).

4.8 Consideraciones finales

Integrando la información discutida en este apartado, nuestros datos indican que algunas dosis de BPA alteran la activación de GJIC en el COC, lo que conduce a una progresión prematura de la meiosis, lo cual afecta directamente la maduración de los ovocitos (Figura 16). Es bien sabido que la maduración del núcleo es un proceso esencial para que el ovocito se convierta en un ovocito fertilizable (Edry y cols., 2006; Tripathi y cols., 2010). Por lo tanto, el mecanismo de toxicidad del BPA observado en el presente estudio puede sumarse y contribuir a los hallazgos anteriormente obtenidos de una reducción de la capacidad de los ovocitos de ratón para ser fertilizados por un espermatozoide (Moore-Ambriz y cols., 2015). Es prudente seguir evaluando los efectos del BPA en concentraciones muy bajas (por debajo de las dosis de referencia de 4 y 50 µg/kg/d de acuerdo con EFSA y EPA, respectivamente) y por tiempo prolongados de exposición, debido a que el uso de los artículos y productos que contienen BPA es constante en la vida actual.

El BPA continúa siendo tema de controversia y es sujeto a regulación y prohibición en diferentes países. Es complicado tener un solo criterio al tomar decisiones acerca del uso de este compuesto. Los desacuerdos pueden deberse principalmente al amplio rango de concentraciones que se manejan para la NOAEL, que van desde 5 µg/kg hasta 50 mg/kg/d, causando conflictos al momento de tomar una decisión sobre su uso (CERHR, 2008; Vandenberg, 2015; Gundert-Remy y cols., 2016). Sin embargo, la prohibición del uso de este polimerizante viene ligada a la autorización de productos químicos nuevos de los cuales podemos desconocer su toxicidad. Consideramos que el conocimiento de los efectos del BPA sobre los diferentes procesos fisiológicos debe aumentar la idiosincrasia de los consumidores y hacerlos responsables en el uso de los productos plásticos que puedan contener policarbonato.

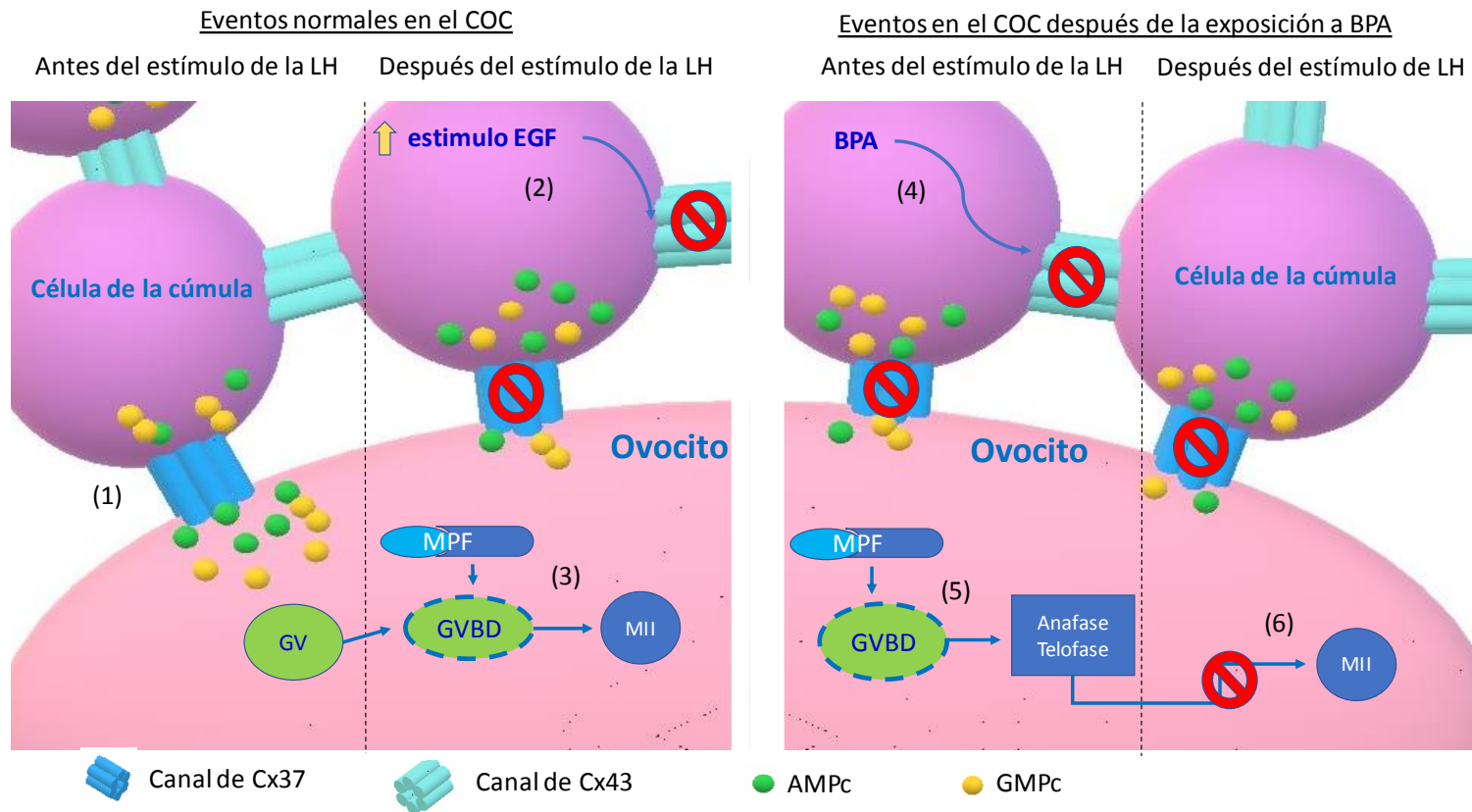


Figura 16. Modelo propuesto del efecto del bisfenol A (BPA) sobre la reanudación y progresión de la meiosis en el ovocito. Antes de que se dé el estímulo de la hormona LH, nucleótidos como el AMPc y GMPc son transferidos a través de la comunicación inter celular mediada por uniones Gap (GJIC) (1). Después del estímulo de la LH, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) detona el cierre de las uniones Gap (2), de este modo se provoca una caída en el flujo de los nucleótidos, lo cual promueve la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) así como el arresto en metafase II (MII) (3). El BPA puede cerrar prematuramente y/o bloquear la GJIC (4), de esta manera se detona la GVBD y el arresto en los estadios de anafase y telofase (5), sin que el proceso alcance la MII (6). COC, complejo o vocito-células de la cúmula; GV, vesícula germinal; GVBD, ruptura de la vesícula germinal; MPF, factor promotor de la maduración.

5. Conclusiones

Las conclusiones que obtuvimos del presente estudio son las siguientes:

- La exposición de COCs a BPA en concentraciones ambientalmente relevantes promovió una reanudación prematura del ovocito, previa al estímulo de maduración.
- La exposición a BPA del COC promovió un arresto del proceso meiótico en los estadios de anafase y telofase durante la maduración *in vitro* de los COCs murinos.
- El BPA disminuyó la GJIC en el COC, entre las células de la cúmula y entre las células de la cúmula y el ovocito, sin alterar la expresión de los genes de las conexinas que forman las uniones Gap en el COC ni afectar la presencia de la proteína Cx43 formadora de las uniones gap en las células de la cúmula.
- El efecto en el arresto del proceso meiótico se relacionó directamente con la alteración de la GJIC en el COC debido a la exposición al BPA.
- El BPA disminuyó la expansión de las células de la cúmula durante la maduración del ovocito.

6. Perspectivas

Las perspectivas generadas por el presente estudio son las siguientes:

- Evaluar posibles mecanismos celulares y moleculares, en las células de la cúmula provocados por el BPA, que alteren la GJIC y afecten el proceso de maduración del ovocito. Mecanismos como:
 - Efecto del BPA sobre la presencia y función de proteínas involucradas en la reanudación de la meiosis (CDK1, ciclina B, PDE3A, etc.).
 - Evaluar la dinámica de los microtúbulos, pericentrina y otras proteínas involucradas en la formación del huso meiótico y del primer cuerpo polar).
 - Evaluar la interacción de los conexones en el ovocito con las células del citoesqueleto.
- Evaluar la capacidad fértil de los ovocitos, formación del segundo cuerpo polar y primeras divisiones del cigoto.
- Evaluar el efecto del BPA sobre la presencia y funcionalidad de las uniones Gap del COC en un sistema *in vivo*.
- Evaluar el o los mecanismos de acción del BPA sobre la funcionalidad de las células de la cúmula después de la exposición *in vivo* del COC.

7. Referencias

Acconcia F, Pallottini V, & Marino M (2015). Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose Response*, 13, 1559325815610582.

Adewale HB, Jefferson WN, Newbold RR, & Patisaul HB (2009). Neonatal bisphenol-a exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod*, 81, 690-699.

Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquié M, Gauthier BR et al. (2008). Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One*, 3, e2069.

Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I et al. (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect*, 118, 1243-1250.

Angle BM, Do RP, Ponzi D, Stahlhut RW, Drury BE, Nagel SC et al. (2013). Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reprod Toxicol*, 42, 256-268.

Atkinson A & Roy D (1995). In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). *Biochem Biophys Res Commun*, 210, 424-433.

Berger RG, Hancock T, & deCatanzaro D (2007). Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice. *Reprod Toxicol*, 23, 138-144.

Bondesson M, Jönsson J, Pongratz I, Olea N, Cravedi JP, Zalko D et al. (2009). A CASCADE of effects of bisphenol A. *Reprod Toxicol*, 28, 563-567.

Campen KA, McNatty KP, & Pitman JL (2017). A protective role of cumulus cells after short-term exposure of rat cumulus cell-oocyte complexes to lifestyle or environmental contaminants. *Reprod Toxicol*, 69, 19-33.

Can A, Semiz O, & Cinar O (2005). Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol Hum Reprod*, 11, 389-396.

Cantonwine D, Meeker JD, Hu H, Sánchez BN, Lamadrid-Figueroa H, Mercado-García A et al. (2010). Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environ Health*, 9, 1-7.

Cárdenas-González MC, Del Razo LM, Barrera-Chimal J, Jacobo-Estrada T, López-Bayghen E, Bobadilla NA et al. (2013). Proximal renal tubular injury in rats sub-chronically exposed to low fluoride concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol*, 272, 888-894.

Case AM (2003). Infertility evaluation and management. Strategies for family physicians. *Can Fam Physician*, 49, 1465-1472.

CERHR. Center for the Evaluation of Risk to Human Reproduction (2008). *NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A* (Rep. No. NIH publication No. 08-5994).

Chen L, Russell PT, & Larsen WJ (1993). Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol Reprod Dev*, 34, 87-93.

Conti M, Hsieh M, Zamah AM, & Oh JS (2012). Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol*, 356, 65-73.

Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, Brooks BW (2015). Global assessment of bisphenol A in the environment: review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose Response*, 13, 1559325815598308.

De Coster S & van Larebeke N (2012). Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health*, 2012.

Dekel N (2005). Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol*, 234, 19-25.

Edmonds JS, Nomachi M, Terasaki M, Morita M, Skelton BW, & White AH. (2004). The reaction of bisphenol A 3,4-quinone with DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 319[2], 556-561.

Edry I, Sela-Abramovich S, & Dekel N (2006). Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. *Mol Cell Endocrinol*, 252, 102-106.

Ehrlich S, Williams PL, Hauser R, Missmer SA, Peretz J, Calafat AM et al. (2013). Urinary bisphenol A concentrations and cytochrome P450 19 A1 (Cyp19) gene expression in ovarian granulosa cells: an in vivo human study. *Reprod Toxicol*, 42, 23.

Ehrlich S, Williams PL, Missmer SA, Flaws JA, Ye X, Calafat AM et al. (2012). Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Hum Reprod*, 27, 3583-3592.

Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Cukurcam S, Sun F, Pacchierotti F, & Parry J (2008). Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutat Res*, 651, 82-92.

Eppig JJ & Downs SM (1987). The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Dev Biol*, 119, 313-321.

FAO/WHO Expert Meeting (2010). Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A. Summary Report

Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Hockney JE, Herrick JR, & Kennedy-Stoskopf S (2007). The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod Sci*, 98, 97-112.

Félix-Cañedo TE, Durán-Álvarez JC, & Jiménez-Cisneros B (2013). The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Sci Total Environ*, 454-455, 109-118.

Fernandez M, Bourguignon N, Lux-Lantos V, & Libertun C (2010). Neonatal Exposure to Bisphenol A and Reproductive and Endocrine Alterations Resembling the Polycystic Ovarian Syndrome in Adult Rats. *Environ Health Perspect*, 118, 1217-1222.

Fulka J Jr, First NL, & Moor RM (1998). Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod*, 4, 41-49.

Gershon E, Plaks V, & Dekel N (2008). Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Mol Cell Endocrinol*, 282, 18-25.

Gibson R, Durán-Álvarez JC, Estrada KL, Chávez A, & Jiménez Cisneros B (2010). Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*, 81, 1437-1445.

Ginsberg G & Rice DC (2009). Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Perspect*, 117, 1639-1643.

González-Castro MI, Olea-Serrano MI, Rivas-Velasco AM, Medina Rivero E, Ordoñez-Acevedo LG, & De León-Rodríguez A (2011). Phthalates and bisphenols migration in Mexican food cans and plastic food containers. *Bull Environ Contam Toxicol*, 86, 627-631.

Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS et al. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev*, 36, E1-E150.

Gundert-Remy U, Bodin J, Bosetti C, FitzGerald R, Hanberg A, Hass U et al. (2017). Draft Bisphenol A (BPA) hazard assessment protocol. *European Food Safety Authority, Technical Report*.

Hernández-Ochoa I, Paulose T, & Flaws JA (2018). Ovarian Toxicology. In McQueen ChA (Ed.), *Comprehensive Toxicology* (Third Edition ed., pp. 341-361). Alabama: Elsevier.

Hiroi H, Tsutsumi O, Momoeda M, Takai Y, Osuga Y, & Taketani Y (1999). Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocr J*, 46, 773-778.

Hoyer PB (2005). Damage to ovarian development and function. *Cell Tissue Res*, 322, 99-106.

Hsieh M, Lee D, Panigone S, Horner K, Chen R, Theologis A et al. (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol Cell Biol*, 27, 1914-1924.

Huang C, Wu D, Khan FA, Jiao X, Guan K, & Huo L (2016). The GTPase SPAG-1 orchestrates meiotic program by dictating meiotic resumption and cytoskeleton architecture in mouse oocytes. *Mol Biol Cell*, 27, 1776-1786.

Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC et al. (2003). Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol*, 13, 546-553.

IMSS. (2018). Instituto Mexicano del Seguro Social. www.imss.gob.mx

Iwase Y, Fukata H, & Morita Y (2006). Estrogenic compounds inhibit gap junctional intercellular communication in mouse Leydig TM3 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 212, 237-246.

Junk SM, Dharmarajan A, & Yovich JL (2003). FSH priming improves oocyte maturation, but priming with FSH or hCG has no effect on subsequent embryonic development in an in vitro maturation program. *Theriogenology*, 59, 1741-1749.

Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Livadas S, Palioura E, Economou F, Koutsilieris M et al. (2011). Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*, 96, E480-E484.

Kidder GM & Mhawi AA (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, 123, 613-620.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT et al. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139, 4252-4263.

Kurebayashi H, Betsui H, & Ohno Y (2003). Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci*, 73, 17-25.

Lane M & Gardner DK (2004). Preparation of Gametes, in Vitro Maturation, in Vitro Fertilization, and Embryo Recovery and Transfer. In Gardner DK, Lane M, & Watson AJ (Eds.), *A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo* (pp. 24-40). OXFORD University Press.

Le HH, Carlson EM, Chua JP, & Belcher SM (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett*, 176, 149-156.

Lee IK & Rhee SK (2007). Inhibitory effect of bisphenol A on gap junctional intercellular communication in an epithelial cell line of rat mammary tissue. *Arch Pharm Res*, 30, 337-343.

Lenie S, Cortvrintdt R, Eichenlaub-Ritter U, & Smitz J (2008). Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutat Res*, 651, 71-81.

Li MW, Mruk DD, Lee WM, & Cheng CY (2009). Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 2302-2314.

Lu Z, Xia G, & Zhang J (2001). Protein kinase C, rather than protein kinase A is involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. *Mol Cell Endocrinol*, 182, 225-232.

Lubick N (2010). Cardiovascular health: exploring a potential link between BPA and heart disease. *Environ Health Perspect*, 118, A 116.

Machtinger R, Combelles CM, Missmer SA, Correia KF, Williams P, Hauser R et al. (2013). Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Hum Reprod*, 28, 2735-2745.

Machtinger R & Orvieto R (2014). Bisphenol A, oocyte maturation, implantation, and IVF outcome: review of animal and human data. *Reprod Biomed Online*, 29, 404-410.

Mansur A, Adir M, Racowsky C, Combelles CM, Landa N, & Machtinger R (2017). Susceptibility of human cumulus cells to bisphenol a In vitro. *Reprod Toxicol*, 74, 194.

Marino M, Pellegrini M, La Rosa P, & Acconcia F (2012). Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. *Steroids*, 77, 910-917.

Martínez-Núñez JM, Altagracia-Martínez M, Kravzov-Jinich J, Hinojosa-Cruz JC, Sánchez-Sánchez B, & Díaz de León-Castañeda C (2012). Estudio de la carga económica de la infertilidad femenina por anovulación en un hospital público de México: estudio piloto. *Rev Mex Cienc Farm*, 43.

Michalowicz J (2014). Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*, 37, 738-758.

Mlynarcíková A, Nagyova E., Ficková E, & Scsuková S (2009). Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol In Vitro*, 23, 371-377.

Mondadori RG, Neves JP, & Gonçalves PB (2008). Protein kinase C (PKC) role in bovine oocyte maturation and early embryo development. *Anim Reprod Sci*, 107.

Mohri T & Yoshida S (2005). Estrogen and bisphenol A disrupt spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 326, 166-173.

Moore-Ambriz TR, Acuña-Hernández DG, Ramos-Robles B, Sánchez-Gutiérrez M, Santacruz-Márquez R, Sierra-Santoyo A et al. (2015). Exposure to bisphenol A in young adult mice does not alter ovulation but does alter the fertilization ability of oocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 289, 507-514.

Munguia-Lopez EM, Peralta E, Gonzalez-Leon A, Vargas-Requena C, & Soto-Valdez H (2002). Migration of Bisphenol A (BPA) from Epoxy Can Coatings to Jalapeño Peppers and an Acid Food Simulant. *Agric Food Ch*, 50, 7299-7302.

Newbold RR (2010). Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones*, 9, 206-217.

Newbold RR, Jefferson WN, & Padilla-Banks E (2007). Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol*, 24, 253-258.

Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL et al. (2008). Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*, 135, 3229-3238.

Ochi T (1999). Induction of multiple microtubule-organizing centers, multipolar spindles and multipolar division in cultured V79 cells exposed to diethylstilbestrol, estradiol-17beta and bisphenol A. *Mutat Res*, 431, 105-121.

Oh S (2015). Bisphenol A and 4-tert-Octylphenol Inhibit Cx46 Hemichannel Currents. *Korean J Physiol Pharmacol*, 19, 73-79.

Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Mura E, Quinn MJ Jr, Lavoie E, Palanza P et al. (2007). Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits. *Front Neuroendocrinol*, 28, 179-200.

Pepling ME, Sundman EA, Patterson NL, Gephardt GW, Medico L Jr, & Wilson KI (2010). Differences in oocyte development and estradiol sensitivity among mouse strains. *Reproduction*, 139, 349-357.

Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, & Waechter JM Jr (2000). The Relative Bioavailability and Metabolism of Bisphenol A in Rats Is Dependent upon the Route of Administration. *Toxicol Sci*, 54, 3-18.

Ramirez-Trejo I (2017). *Efecto tóxico del bisfenol A sobre las proteínas que contribuyen con la expansión de las células de la cúmula alrededor del ovocito*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.

Ratchford AM, Esguerra CR, & Moley KH (2008). Decreased oocyte-granulosa cell gap junction communication and connexin expression in a type 1 diabetic mouse model. *Mol Endocrinol*, 22, 2643-2654.

Richani D & Gilchrist RB (2018). The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update*, 24, 1-14.

Richards JS & Pangas SA (2010). New insights into ovarian function. *Handb Exp Pharmacol*, 198, 3-27.

Ritter LJ, Sugimura S, & Gilchrist RB (2015). Oocyte induction of EGF responsiveness in somatic cells is associated with the acquisition of porcine oocyte developmental competence. *Endocrinology*, 156, 2299-2312.

Russell DL & Robker RL (2007). Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*, 13, 289-312.

Salian S, Doshi T, & Vanage G (2009). Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*, 265, 56-67.

Salustri A (2000). Paracrine actions of oocytes in the mouse pre-ovulatory follicle. *Int J Dev Biol*, 44, 591-597.

Salvatierra-Stamp Vdel C, Ceballos-Magaña SG, Gonzalez J, Jurado JM, & Muñoz-Valencia R (2015). Emerging contaminant determination in water samples by liquid chromatography using a monolithic column coupled with a photodiode array detector. *Anal Bioanal Chem*, 407, 4661-4670.

Santiquet NW, Develle Y, Laroche A, Robert C, & Richard FJ (2012). Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. *Biol Reprod*, 87, 1-8.

Sasseville' M, Gagnon MC, Guillemette C, Sullivan R, Gilchrist RB, & Richard FJ (2009). Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Mol Endocrinol*, 23, 700-710.

Scarchilli L, Camaioni A, Bottazzi B, Negri V, Doni A, Deban L et al. (2007). PTX3 interacts with inter-alpha-trypsin inhibitor: implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion. *J Biol Chem*, 282, 30161-30170.

Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, & Chahoud I (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect*, 110, A703-A707.

Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, & Dekel N (2006). Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*, 147, 2280-2286.

Sharara FI, Seifer DF, & Flaws JA (1998). Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril*, 70, 613-622.

Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikolaev VO, Thunemann M et al. (2015). Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 5527-5532.

Spearow JL, Doemeny P, Sera R, Leffler R, & Barkley M (1999). Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science*, 285, 1259-1261.

Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, & Suzumori K (2005). Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*, 20, 2325-2329.

Susiarjo M, Hassold TJ, Freeman E, & Hunt PA (2007). Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet*, 3, e5.

Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y et al. (2002). Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol*, 16, 107-116.

Tarapore P, Ying J, Ouyang B, Burke B, Bracken B, & Ho SM (2014). Exposure to bisphenol A correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro. *PLoS One*, 9, e90332.

Teegarden JG, Twaddle NC, Churchwell MI, Yang X, Fisher JW, Seryak LM et al. (2015). 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicol Appl Pharmacol*, 288, 131-142.

Thayer KA, Doerge DR, Hunt D, Schurman SH, Twaddle NC, Churchwell MI et al. (2015). Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ Int*, 83, 107-115.

Tiwari D, Kamble J, Chilgunde S, Patil P, Maru G, Kawle D et al. (2012). Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor. *Mutat Res*, 743, 83-90.

Tiwari M & Chaube SK (2017). Carbenoxolone reduces cyclic nucleotides level, destabilizes maturation promoting factor and induces meiotic exit from diplotene arrest in rat cumulus oocytes complexes cultured in vitro. *Biomed Pharmacother*, 94, 230.

Yokoo M & Sato E (2004). Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *Int Rev Cytol*, 235, 251-291.

Tripathi A, Kumar KV, & Chaube SK (2010). Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol*, 223, 592-600.

Vaccari S, Weeks JL 2nd, Hsieh M, Menniti FS, & Conti M (2009). Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*, 2009, 3-595.

Vandenberg LN (2015). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose Response*, 12, 259-276.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH et al. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*, 33, 378-455.

Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, & Soto AM (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev*, 30, 75-95.

Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL, Lower M, Muñoz-de-Toro M, & Luque EH (2011). Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology*, 152, 1101-1111.

Villar-Pazos S, Martinez-Pinna J, Castellano-Muñoz M, Alonso-Magdalena P, Marroqui L, Quesada I et al. (2017). Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on ca²⁺ entry in mouse pancreatic β-cells. *Sci Rep* 7[1], 11770.

Völkel W, Bittner N, & Dekant W (2005). Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 33, 1748-1757.

vom Saal FS & Hughes C (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect*, 113, 926-933.

Wade MH, Trosko JE, & Schindler M (1986). A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. *Science*, 232, 525-528.

Wang T, Han J, Duan X, Xiong B, Cui XS, Kim NH et al. (2016). The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine in vitro. *Oncotarget*, 7, 32554-32565.

Wei J, Lin Y, Li Y, Ying C, Chen J, Song L et al. (2011). Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology*, 152, 3049-3061.

Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Watson CS et al. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*, 24, 178-198.

Winterhager E & Kidder GM (2015). Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Hum Reprod Update*, 21, 340-352.

Xu XL, Ma W, Zhu YB, Wang C, Wang BY, An N et al. (2012). The microtubule-associated protein ASPM regulates spindle assembly and meiotic progression in mouse oocytes. *PLoS One*, 7, e49303.

Yamashita Y & Shimada M (2012). The release of EGF domain from EGF-like factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process. *J Reprod Dev*, 58, 510-514.

Yokoo M, Kimura N, Abe H, & Sato E (2008). Influence of hyaluronan accumulation during cumulus expansion on in vitro porcine oocyte maturation. *Zygote*, 16, 309-314.

Yokoo M, Kimura N, & Sato E (2010). Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *J Reprod Dev*, 56, 15-19.

Zhuo L & Kimata K (2001). Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct Funct*, 26, 189-196.

Ziv-Gal A, Wang W, Zhou C, & Flaws JA (2015). The effects of in utero bisphenol A exposure on reproductive capacity in several generations of mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 284, 354-362.

8. Anexo

Artículo científico producto de esta tesis.